



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147 incorporadas en recubrimientos comestibles para la preservación de queso campesino

Adriana Paola Jutinico Shubach

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2018

Efecto de bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147 incorporadas en recubrimientos comestibles para la preservación de queso campesino

Adriana Paola Jutinico Shubach

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Ph.D. Héctor Suárez Mahecha

Codirectora:

MSc., Ph.D. Carolina Gutiérrez Cortés

Línea de Investigación:

Calidad de alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2018

*A mis padres Solange Shubach y Daniel
Jutinico, por su amor y apoyo incondicional en cada
meta trazada a lo largo de mi vida*

*A mi hermana Laura Marcela Jutinico Shubach
por su compañía, consejos y palabras de ánimo para
continuar este camino.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Facultad de Ciencias Agrarias por permitirme la continuación de mis estudios de posgrado en investigación.

A la Dirección académica y Facultad de Ciencias Agrarias por la beca Asistente Docente que me permitió realizar mi maestría y formarme en el campo de docencia e investigación.

A la División de Investigaciones de la sede Bogotá por la financiación para el desarrollo de mi tesis.

Al profesor Jaiver Eduardo Rosas Pérez de la Facultad de Farmacia por facilitarme el equipo lector de ELISA.

A mi amigo y compañero Harold Rojas por su asesoría en el diseño experimental y análisis estadísticos en R Studio.

De manera especial quiero agradecer:

A mi director de tesis, el Doctor Héctor Suárez Mahecha por su orientación y apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

A mi codirectora, la Doctora Carolina Gutiérrez Cortés por su valiosa asesoría, su motivación y enseñanzas durante el proceso.

A la profesora, la Doctora Ruth Sánchez Mérida, por su asesoría y apoyo incondicional, además del aporte de materiales para el desarrollo de mi tesis.

A Laura Marcela Jutinico Shubach, Magister en Ciencias-Bioquímica, por su asesoría en realización de análisis y protocolos de la parte experimental química.

A las profesoras de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, en especial a la profesora Sandra Gómez Caro por aceptarme para apoyar el curso de fitopatología en la beca Asistente docente y por facilitarme el laboratorio de microbiología para desarrollo de mis experimentos.

Resumen

La biopreservación de alimentos es referida a la extensión de la vida útil y mejoramiento de la seguridad de los alimentos mediante el uso de agentes antimicrobianos de origen natural tal como bacteriocinas. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto antagónico de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus pentosaceus* 147 incorporadas en recubrimientos comestibles de quitosano frente a *Listeria monocytogenes*. Inicialmente, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* (8533,3 UA/mL) y la concentración mínima inhibitoria - CMI (5,72 µg/mL) del sobrenadante libre de células (SLC) que contenía bacteriocinas. Posteriormente, se realizó la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de recubrimientos comestibles de quitosano con la incorporación de la CMI de las bacteriocinas para su evaluación sobre queso fresco tipo campesino. Se realizaron 5 tratamientos sobre el queso: T1 queso control, T2 control de crecimiento del inóculo, T3 queso con la aplicación directa de SLC, T4 queso con recubrimiento de quitosano sin SLC y T5 queso con recubrimiento de quitosano con SLC. Los tratamientos T2 a T5 fueron inoculados con una concentración de inóculo de aproximadamente 10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes*. Se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos durante el tiempo de almacenamiento. Los resultados demuestran que las bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147 reducen el crecimiento de *L. monocytogenes* postproducción sobre queso campesino y estas podrían actuar de forma sinérgica junto con el quitosano.

Palabras clave: Biopreservación, lácteos, empaques comestibles, bacterias ácido-lácticas, quitosano.

Abstract

Biopreservation is referred as the extension of shelf life and enhanced safety of food by using natural antimicrobial agents as bacteriocins. In this research the antimicrobial effect of edible coating incorporated with bacteriocins produced by *Pediococcus pentosaceus* 147 was evaluated against *Listeria monocytogenes*. Firstly, the antimicrobial activity in vitro (8533,3 AU/mL) and the minimum inhibitory concentration - MIC (5,72 µg/mL) of the cell-free supernatant (CFS) from bacteriocins were found. Secondly, characterization of physicochemical properties of chitosan edible coatings incorporated the MIC of the bacteriocins was carried out for their posterior evaluation on fresh cheese. Five treatments were tested on Campesino fresh cheese: T1 control cheese, T2 growth control of inoculum, T3 cheese with direct addition of CFS, T4 cheese with addition of chitosan coating without CFS and T5 cheese with addition of chitosan coating with CFS. Treatments T2 to T5 were inoculated with approx. 10^4 CFU/mL of *Listeria monocytogenes*. Physicochemical and microbiological analyses were performed during storage. These results show that the bacteriocins from *P. pentosaceus* 147 reduce the Listerial-growth postproduction on cheese samples during storage and these may act with a synergistic effect with chitosan.

Keywords: Biopreservation, dairy products, packaging, lactic acid bacteria, chitosan.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Capítulo I. Bacteriocinas y su producción a partir del género <i>Pediococcus</i> sp. para la biopreservación de alimentos.	3
1.1 Bacteriocinas.....	3
1.1.1 Antecedentes.....	3
1.1.2 Generalidades de las bacteriocinas	5
1.1.3 Clasificación.....	6
1.1.4 Mecanismo de acción.....	7
1.2 Bacteriocinas producidas a partir de bacterias ácido-lácticas (BAL) pertenecientes al género <i>Pediococcus</i> spp.....	8
1.2.1 Biosíntesis y producción de bacteriocinas	10
1.2.2 Aplicación de bacteriocinas en sistemas alimentarios	12
1.3 Recubrimientos comestibles	14
1.3.1 Quitosano	15
1.4 Queso fresco tipo campesino	16
1.4.1 Estudio de bacteriocinas sobre diferentes tipos de queso	17
1.5 Objetivos.....	22
1.5.1 Objetivo general	22
1.5.2 Objetivos específicos.....	22
1.6 Referencias	23
2. Capítulo II. Caracterización de la actividad antimicrobiana y cuantificación de la bacteriocina de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 147 frente a <i>Listeria monocytogenes</i> <i>in vitro</i>	33
2.1 Introducción.....	33
2.2 Metodología.....	35
2.2.1 Cepas bacterianas y condiciones del cultivo	35
2.2.2 Obtención del Sobrenadante Libre de Células (SLC) a partir de cepas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 147	35
2.2.3 Purificación parcial de la bacteriocina.....	35

2.2.4	Determinación de la actividad antimicrobiana	36
2.2.5	Cuantificación proteínas totales por el método de Bradford	36
2.2.6	Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)	37
2.3	Resultados y discusión	38
2.3.1	Purificación parcial de la bacteriocina de <i>P. pentosaceus</i> 147	38
2.3.2	Determinación de la actividad antimicrobiana	39
2.3.3	Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford	41
2.3.4	Análisis purificación parcial de la bacteriocina	43
2.3.5	Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	45
2.4	Conclusiones.....	47
2.5	Referencias	47
 3. Capítulo III. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de películas comestibles de quitosano incorporadas con bacteriocinas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 147		
3.1	Introducción.....	56
3.2	Materiales y métodos	57
3.2.1	Elaboración de recubrimientos comestibles	57
3.2.2	Permeabilidad del vapor del agua.....	58
3.2.3	Contenido de humedad y solubilidad en agua.....	59
3.2.4	Color	59
3.2.5	Transmisión de luz y opacidad.....	60
3.2.6	Propiedades mecánicas	60
3.2.7	Determinación de la actividad antilisteria de recubrimientos comestibles con quitosano	61
3.2.8	Evaluación de la morfología por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .	61
3.2.9	Análisis estadísticos	61
3.3	Resultados y discusión	62
3.3.1	Propiedades fisicoquímicas.....	62
3.3.2	Color	64
3.3.3	Propiedades mecánicas	66
3.3.4	Determinación de la actividad antilisteria de recubrimientos comestibles con quitosano	68
3.3.5	Evaluación de la morfología por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .	70
3.4	Conclusiones.....	72
3.5	Referencias	72
 4. Capítulo IV. Estudio del efecto de un recubrimiento comestible en el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> durante el almacenamiento de queso campesino		
4.1	Introducción.....	77
4.2	Materiales y métodos	79
4.2.1	Preparación del queso fresco tipo campesino	79
4.2.2	Inoculación y revestimiento de muestras de queso campesino	79
4.2.3	Análisis microbiológicos	80
4.2.4	Análisis fisicoquímicos.....	81
4.2.5	Análisis estadísticos	82
4.3	Resultados y discusión	82
4.3.1	Análisis microbiológicos	83
4.3.2	Análisis fisicoquímicos.....	89

4.4	Conclusiones.....	92
4.5	Referencias	92
5.	Conclusiones generales y recomendaciones.....	97
5.1	Conclusiones.....	97
5.2	Recomendaciones	97
Anexos	99
Bibliografía	105

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Línea de tiempo: comercio y desarrollo de nisina	4
Figura 1-2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas.	8
Figura 1-3 Estructura de la secuencia de aminoácidos de Pediocina PA-1.....	10
Figura 1-4 Representación de la biosíntesis de pediocinas	11
Figura 2-1 Diagrama de flujo del proceso de purificación parcial de bacteriocinas producidas por <i>P. pentosaceus</i> 147.....	39
Figura 2-2 Halos de inhibición de las fracciones obtenidas durante la precipitación con sulfato de amonio.....	40
Figura 2-3 Curva de calibración para la determinación de proteínas totales.	42
Figura 2-4 CMI del SLC de <i>P. pentosaceus</i> 147.....	45
Figura 2-5 Concentración mínima inhibitoria obtenida por macrodilución en caldo del SLC de <i>P. pentosaceus</i> 147	46
Figura 3-1 Permeabilidad de vapor de agua de las películas.....	64
Figura 3-2 Fuerza tensil y porcentaje de elongación	67
Figura 3-3 Actividad antimicrobiana de recubrimientos comestibles de quitosano.....	69
Figura 3-4 Prueba de crecimiento microbiano en halos de inhibición	70
Figura 3-5 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de películas comestibles de quitosano con y sin SLC.....	71
Figura 4-1 Efecto de los tratamientos adicionados sobre queso fresco en el recuento de <i>L. monocytogenes</i>	83
Figura 4-2 Recuento de mesófilos totales durante el periodo de almacenamiento a 4°C de queso campesino.....	87
Figura 5-1 Proceso de producción de queso campesino y aplicación de tratamientos .	101

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1 Investigaciones realizadas con bacteriocinas producidas por cepas de <i>Pediococcus</i> spp.....	13
Tabla 1-2 Características microbiológicas del queso.....	17
Tabla 1-3 Estudios realizados en quesos para el control de crecimiento microorganismos de deterioro y/o patógenos.....	20
Tabla 2-1 Recuento bacteriano cepas bacterianas conservadas a -20°C.....	38
Tabla 2-2 Diámetros de inhibición (mm) del extracto crudo y precipitados obtenidos a partir del tratamiento con sulfato de amonio	40
Tabla 2-3 Determinación de la concentración de proteína total.....	42
Tabla 2-4 Purificación parcial de la bacteriocina producida por <i>P. pentosaceus</i> 147.	43
Tabla 3-1 Propiedades fisicoquímicas de películas comestibles.....	62
Tabla 3-2 Evaluación de color en películas comestibles de quitosano incorporando sobrenadante libre de células de <i>P. pentosaceus</i> 147.	65
Tabla 4-1 Tratamientos para la evaluación del efecto de las bacteriocinas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 147 sobre queso fresco tipo campesino.....	80
Tabla 4-2 Especificaciones de medios y condiciones de cultivo para las pruebas microbiológicas.	81
Tabla 4-3 Recuento de mohos y levaduras totales y psicrófilos en muestras de queso campesino.....	88
Tabla 4-4 Valores de pH y humedad de muestras de queso campesino	89
Tabla 4-5 Valores de L*, a*, b* y diferencia de color (ΔE) de muestras de queso campesino	91

Introducción

La preservación de características nutritivas, microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales de un producto alimenticio son esenciales para la industria de alimentos. Para ello se han implementado estrategias de preservación como el uso de sustancias químicas y/o tratamientos térmicos. Sin embargo, la demanda de los consumidores por alimentos frescos, mínimamente procesados y con bajas concentraciones de preservantes sintéticos genera la necesidad del uso y estudio de alternativas de preservación, tal como la aplicación de sustancias naturales como bacteriocinas que mantienen la estabilidad de un producto (Favaro *et al.*, 2015; Woraprayote *et al.* 2016).

El uso de bacteriocinas como sustancias naturales y seguras que permitan la bioconservación de alimentos, ha sido ampliamente estudiado. Esto con el fin de disminuir y/o evitar el uso de conservantes químicos que se han relacionado con la aparición y desarrollo de enfermedades como por ejemplo cáncer (Grosse *et al.* 2006; IARC 2010; Muhialdin *et al.*, 2013). El interés por el uso de biopreservantes se ha enfocado en la utilización de moléculas bioactivas dentro de las que se encuentran los péptidos antimicrobianos producidos por Bacterias Ácido-Lácticas (BAL). La producción de estas sustancias, se puede realizar aislando BAL a partir de diferentes fuentes; una de ellas alimentos como los productos lácticos (Muhialdin, Hassan y Saari 2013). Un ejemplo de ello es el aislamiento de *Pediococcus pentosaceus* 147, una bacteria Gram positiva aislada de queso artesanal en la Universidad Federal de Viçosa, en Brasil. Gutiérrez-Cortés *et al.* (2018) evidenció que las bacteriocinas producidas por esta bacteria tenían actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, un patógeno de importancia en la industria alimentaria.

Si bien los hallazgos *in vitro* sobre la producción, caracterización y actividad antimicrobiana de esta bacteriocina fueron realizados (Gutiérrez-Cortés *et al.*, 2018a); es indispensable generar nuevos conocimientos sobre su actividad antimicrobiana en una matriz alimentaria (*in situ*) en condiciones de almacenamiento específico; debido a que la actividad puede ser

alterada y/o modificada debido a las interacciones con otros componentes propios de un alimento y degradaciones enzimáticas (Aloui y Khwaldia 2016).

Por lo anterior, en este trabajo de investigación se decidió continuar con el estudio de la actividad antimicrobiana *in situ* de dichas bacteriocinas, específicamente contra *L. monocytogenes*. Este es un patógeno alimentario considerado un problema en salud pública, ya que puede causar desde gastroenteritis hasta infecciones en el sistema nervioso central y cuyo riesgo principal está relacionado con mujeres embarazadas, induciendo parto prematuro, aborto, muerte fetal y/o graves problemas de salud en el recién nacido (Dal *et al.*, 2012; FDA, 2016; Winkelströter *et al.*, 2015). Es importante mencionar que esta bacteria se ha encontrado presente principalmente en productos lácteos y quesos (Gálvez *et al.*, 2014). Por ejemplo, la prevalencia de este microorganismo en quesos frescos en Colombia varía entre 0 y 50%, encontrando que un 96% de los quesos que presentan este patógeno se trata de queso fresco tipo campesino (Sistema Nacional de Salud y Ministerio de Protección Social, 2011), producto que fue escogido para la aplicación de bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147.

Adicionalmente, con el fin de disminuir la inactivación de las bacteriocinas cuando son aplicadas directamente sobre la matriz alimentaria, se han estudiado diferentes estrategias para la adición en el alimento. En este trabajo se utilizó una de estas estrategias, la cual consiste en la aplicación de recubrimientos comestibles de quitosano, cuya función es proteger el alimento de la contaminación exterior, además de incorporar sustancias antimicrobianas como péptidos antimicrobianos (Valdés *et al.*, 2015). Es así como en este trabajo, el objetivo principal fue evaluar el antagonismo de bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147 y quitosano en recubrimientos comestibles frente a *L. monocytogenes* en queso campesino. Para ello, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de la bacteriocina de *P. pentosaceus* 147 y del quitosano frente a *L. monocytogenes*; además se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de películas comestibles que contenían las bacteriocinas y quitosano; y finalmente se estudió el efecto de la película comestible durante el periodo de almacenamiento del queso campesino frente a *L. monocytogenes*.

1. Capítulo I. Bacteriocinas y su producción a partir del género *Pediococcus* sp. para la biopreservación de alimentos.

Resumen

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos con gran potencial para la preservación de alimentos, ya que pueden actuar sobre microorganismos patógenos o de deterioro que afectan la industria alimentaria. En este sentido, se ha hecho relevante tener un acercamiento a las propiedades de las bacteriocinas, en especial las producidas por el género *Pediococcus* spp., y estudios que han demostrado su actividad antagónica cuando son aplicadas a diversos tipos de matriz alimentaria. Por lo tanto, la construcción de esta revisión permite concluir que estas sustancias son ampliamente aplicadas por lo que se sugiere profundizar en estudios que tengan en cuenta la especificidad, aislamiento, caracterización y aplicación de bacteriocinas a nivel in situ.

1.1 Bacteriocinas

1.1.1 Antecedentes

Desde 1920 aproximadamente se inició el estudio de las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos producidos ribosomalmente por bacterias (Kazakov *et al.*, 2011). Los primeros reportes se derivan del descubrimiento del antagonismo entre cepas de *Escherichia coli* por la producción de colicinas. Por otro lado, entre 1933 y 1947 se realizaron los primeros estudios sobre la nisina, que actualmente es una bacteriocina reconocida como segura y avalada para la conservación de alimentos por organismos

como la FDA y la OMS (Cotter *et al.*, 2005). Algunos eventos y fechas importantes de las investigaciones sobre bacteriocinas se encuentran en la Figura 1-1.

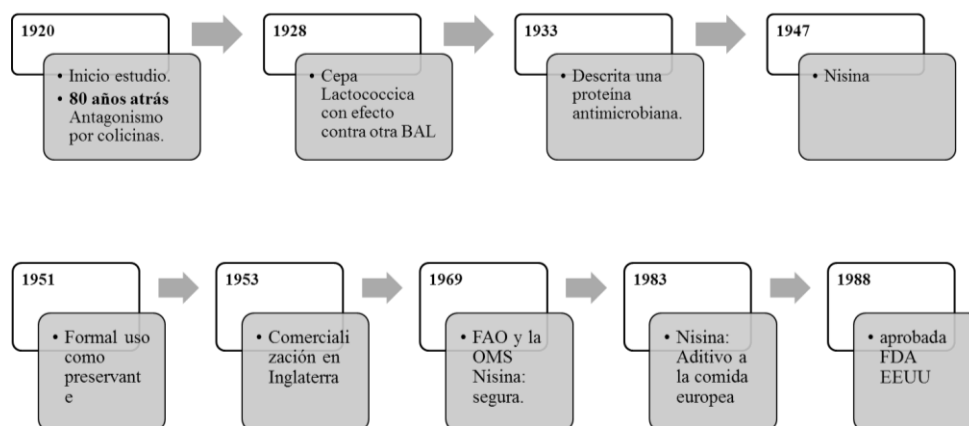


Figura 1-1 Línea de tiempo: comercio y desarrollo de nisina. Modificado de Cotter *et al.* (2005).

Por otro lado, debido al potencial de las bacteriocinas como biopreservantes se han realizado estudios en diversas matrices evaluando su efecto antimicrobiano y de conservación. Grande *et al.* (2005) utilizaron zanahorias, papas, brócoli, champiñones, tomates, entre otros vegetales para evaluar la estabilidad de la enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* S-48. Estos autores encontraron que la presencia de ciertas enzimas afecta de forma negativa la actividad antagonista.

Otro tipo de matrices ampliamente usadas son los filetes y carnes rojas, como es el caso de la cachama (*Piaractus brachipomus x Colossoma macropomum*), la cual fue usada para aplicar un extracto crudo de bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 disminuyendo el recuento de coliformes fecales (Suárez *et al.*, 2008). Esta misma bacteriocina fue evaluada en carnes frescas, e igualmente los coliformes fecales fueron inhibidos durante el periodo de vida útil, además se encontró que el recuento para mesófilos no cambió durante el tiempo (Vásquez M *et al.*, 2009).

Existen diferentes formas de aplicación para evaluar el efecto de las bacteriocinas sobre el crecimiento de microorganismos no deseados, por ejemplo Malheiros *et al.* (2012) encapsuló nisina en liposomas presentando gran actividad frente a *Listeria monocytogenes* en queso fresco. Por otro lado, Barbosa *et al.* (2013) aplicó la nisina en películas de

celulosa en mangos y encontró también un efecto inhibidor contra el mismo patógeno y otros como *Staphylococcus aureus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Bacillus cereus*; sin cambio en las características fisicoquímicas de la matriz. Además de lo anterior, otros estudios con queso, han demostrado la efectividad de películas biodegradables con inclusión de bacteriocinas de *Lactobacillus curvatum* P99 para el control de *L. monocytogenes* (Marques *et al.*, 2017).

Hasta aquí, se puede destacar el uso de diversos tipos de matrices y estrategias para evaluar bacteriocinas focalizadas en el control de microorganismos patógenos y de deterioro, encontrando interesantes resultados de inhibición de microorganismos patógenos.

1.1.2 Generalidades de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son polipéptidos antimicrobianos, de bajo peso molecular, que presentan actividad antagonista contra bacterias de su misma especie (espectro reducido) u otras especies (amplio espectro) (Cavicchioli *et al.*, 2017; Cotter *et al.*, 2005; Drosinos *et al.*, 2008; Malik *et al.*, 2014; Settanni y Corsetti 2008). Generalmente son pequeñas proteínas catiónicas (30 a 60 residuos de aminoácidos) con punto isoeléctrico alto y características anfífilas (Bruno y Montville 1993). A pesar de que su producción puede ser a partir de bacterias Gram negativas y Gram positivas, aquellas que tienen mayor atención son las producidas por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) que tienen gran potencial en su aplicación en alimentos (Salar *et al.*, 2013) y han sido catalogadas por la FDA (“Food and Drug Administration”) como sustancias generalmente consideradas seguras o GRAS (“Generally Regarded as Safe” por sus siglas en inglés) (Ahmad *et al.* 2017; Viana de Souza y Silva Dias 2017).

La extensión de la vida útil de los alimentos mediante el uso de bacteriocinas provenientes de BAL (Perez *et al.*, 2014; Viana de Souza y Silva Dias 2017) se debe principalmente a su espectro antibacteriano contra patógenos Gram positivos como *L. monocytogenes*, *St. aureus* (algunos meticilino-resistente, MRSA) y *Enterococcus* (Vancomicina-resistente, VRE) (Kazakov *et al.*, 2011). Con respecto a su acción contra bacterias Gram negativas, debe comprometerse la integridad de la membrana mediante choques osmóticos o

tratamientos con bajos pH en presencia de detergentes o agentes quelantes, para que las bacteriocinas sean capaces de actuar (Salar *et al.*, 2013).

En cuanto a la biosíntesis de las bacteriocinas, se conoce que ocurre ribosomalmente en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de este; y su producción puede ser debida al estrés ejercido por la competencia por espacio y sustrato en un nicho ecológico. Lo anterior hace que se liberen sustancias con actividad antagónica para obtener una ventaja competitiva (Drosinos *et al.*, 2008).

1.1.3 Clasificación

Las bacteriocinas pueden ser clasificadas de acuerdo a características bioquímicas, presencia de uniones disulfuro o monosulfuro, peso molecular, estabilidad térmica o en presencia de enzimas proteolíticas, de acuerdo a modificaciones postraduccionales de aminoácidos y/o de acuerdo a la acción antimicrobiana (Ahmad *et al.* 2017; Drosinos *et al.*, 2008; Malik *et al.*, 2014).

- **Clase I o lantibióticos:** son termoestables y de bajo peso molecular (<5 kDa), poseen aminoácidos inusuales como lationina (Lan) o 3-metil lationina (meLan) y 2,3-dehidroalanina (Dha) que forman estructuras en anillo (Ahmad *et al.* 2017; Malik *et al.*, 2014; Moll *et al.*, 1999; Woraprayote *et al.* 2016). Se subdividen en lantibióticos tipo A o lineales, los cuales son elongados, catiónicos, anfifílicos y su longitud es de hasta 34 aminoácidos y se caracterizan por formar poros que afecta el potencial de membrana y la bomba efflux (Moll *et al.*, 1999). Por otro lado, los tipos B o globulares, son estructuralmente más compactos con menos de 19 aminoácidos y su modo de acción se basa en la inhibición del lípido II (Malik *et al.*, 2014; Moll *et al.*, 1999).
- **Clase II o no lantibióticos:** son termoestables, catiónicos, con peso molecular de 10 kDa, no contienen lationinas en su estructura y no presentan modificaciones postraduccionales (Malik *et al.*, 2014; Perez *et al.*, 2014). Se subdivide en cuatro subclases: Clase IIa o pediocinas (Fallis, 2013), que tienen gran potencial contra *L. monocytogenes*; Clase IIb, las cuales requieren de dos péptidos para formar un complejo de poración activo; Clase IIc, cuya estructura está basada en una configuración circular (Perez *et al.*, 2014) y la Clase IId que son lineales (Kuo *et al.*, 2013).
- **Clase III:** son péptidos de gran tamaño (>30 kDa), termolábiles, no se modifican a menudo con actividad enzimática (Eds 2011; Malik *et al.*, 2014; Salar *et al.* 2013) .

Dentro de estas se encuentran las bacteriolisinas o Clase IIIa y bacteriocinas no líticas o Clase IIIb (Ramu *et al.*, 2015).

- **Clase IV:** bacteriocinas complejas que poseen un componente mitad lípido o carbohidrato (Eds, 2011; Salar *et al.*, 2013).

1.1.4 Mecanismo de acción

Las bacteriocinas puede actuar mediante la formación de poros, degradación del ADN e inhibición de la síntesis de peptidoglicano (Cavicchioli *et al.* 2017; Cotter *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2013). Como resultado de diferentes investigaciones, se conoce que estas pueden actuar sobre la envoltura celular y/o por medio de la inhibición de la expresión de proteínas como se menciona a continuación.

- **Mecanismo asociado a la envoltura celular:** Estos mecanismos son usualmente usados contra bacterias Gram positivas y su acción es sobre el lípido II conocido por ser la molécula precursora de la síntesis de la pared celular. Como se observa en Figura 1-2 las bacteriocinas, como las nisinas, usan el lípido II como acoplamiento molecular o docking lo que resulta en la pérdida de potencial de membrana y muerte celular ya que evita la síntesis del peptidoglicano. Por otro lado, se conoce que los péptidos de clase IIa y algunos otros de clase II, tal como la lactococina A127, usan el sistema de fosfotransferasa de absorción de la manosa (Man-PTS), asociado a la envoltura celular y lideran la formación de poros (Cotter *et al.*, 2013).

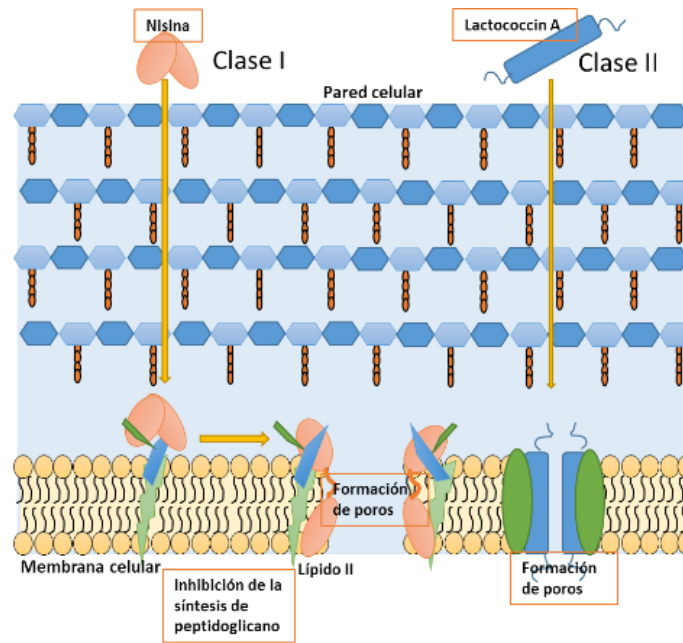


Figura 1-2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas. La formación de poros es generada por el acoplamiento de las bacteriocinas sobre el lípido II o a sistemas de fosfotransferasa. Modificada de (Cotter *et al.*, 2013).

- **Mecanismo de inhibición y expresión de proteínas:** Estos mecanismos son usualmente usados contra bacterias Gram negativas, mediante la interferencia del ADN, ARN y/o proteínas del metabolismo, actuando sobre la DNA girasa, RNA polimerasa y la aspartil RNAt sintetasa. Dentro de las bacteriocinas que poseen esta acción se encuentran las microcinas como MccB17, MccJ25 y la MccC7-C51, producidas por enterobacterias (Cotter *et al.*, 2013).

1.2 Bacteriocinas producidas a partir de bacterias ácido-lácticas (BAL) pertenecientes al género *Pediococcus* spp.

Las BAL son usadas frecuentemente en alimentos, con el fin de mejorar características como textura, sabor y además contribuir en la preservación de un alimento. Estas características son dadas debido a que durante los procesos fermentativos, las BAL producen diferentes tipos de azúcares, ácido acético, etanol, diacetilo, acetona, exopolisacáridos, proteasas específicas y bacteriocinas (Porto *et al.*, 2017). Dentro de este grupo de bacterias se encuentra el género *Pediococcus* spp., son bacterias Gram positivas,

pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae*, que a menudo se encuentran en los alimentos que han sido sometidos a procesos de fermentación como quesos, verduras fermentadas, carnes, salchichas, etc. En cuanto a su morfología son cocos formados en pares o tétradas; son bacterias catalasa negativa, no motiles, no formadoras de esporas, crecen a pH 5,0 y se consideran anaerobios facultativos (North y Zealand 2011).

En general, las bacterias pertenecientes al género *Pediococcus* sp., producen bacteriocinas conocidas como pediocinas, estables a temperaturas entre 4 a 100 °C (Cavicchioli *et al.*, 2017; Gutiérrez-Cortés *et al.*, 2018a). Tienen un amplio espectro de actividad contra cepas de bacterias Gram positivas como *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Lactococcus* spp. (Cavicchioli *et al.* 2017; North y Zealand 2011) y en especial contra patógenos como *L. monocytogenes*; teniendo en cuenta que pueden llegar a ser efectivas incluso en cantidades nanomolares (Porto *et al.*, 2017).

Las pediocinas pertenecen al grupo de bacteriocinas de clase IIa, caracterizadas por ser péptidos que no tienen modificaciones postraduccionales (Chen y Hoover 2003). Son de tamaño pequeño (<5 kDa), termoestables, contienen entre 36 y 48 residuos de aminoácidos (Albano *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2017) y se presentan en soluciones acuosas como conformaciones no estructuradas con espirales aleatorias; mientras que en soluciones no acuosas las pediocinas adoptan una estructura en parte helicoidal con cantidades variables de hidrofobicidad (Espitia *et al.*, 2016). Su estructura está conformada por dos regiones una región conservada N-terminal YGNGVX₁CX₂K/NX₃X₄C (X₁₋₄: residuos polares cargados o no cargados), hidrofílica; y una región C-terminal, hidrofóbica, anfifílica, responsable del reconocimiento celular (Porto *et al.*, 2017).

Pediocina PA-1 es una de las bacteriocinas destacadas producida por *Pediococcus acidilactici*, ha sido ampliamente estudiada y es considerada como buen biopreservante (Albano *et al.*, 2007). La región catiónica, N-terminal, presenta tres cadenas con una lámina β antiparalela soportada por un enlace disulfuro, que consiste en dos residuos de cisteína (C₉ y C₁₄). Al final de la estructura, la cola C-terminal contiene dos residuos de cisteína (C₂₄ y C₄₄) que se pliega sobre la α -hélice central por un enlace disulfuro, creando un dominio similar a una horquilla, tal como se observa en la Figura 1-3 (Espitia *et al.*, 2016).

Por otro lado, el mecanismo de acción de las pediocinas es a través de la formación de poros, donde la región C- terminal penetra la parte hidrofóbica de la membrana celular del microorganismo susceptible. Durante este proceso la horquilla hidrofóbica se sumerge en la membrana (Espitia *et al.*, 2016). Se ha sugerido que el receptor manosa permeasa, es el blanco presente en *L. monocytogenes* en donde estas bacteriocinas se unen (Porto *et al.*, 2017).

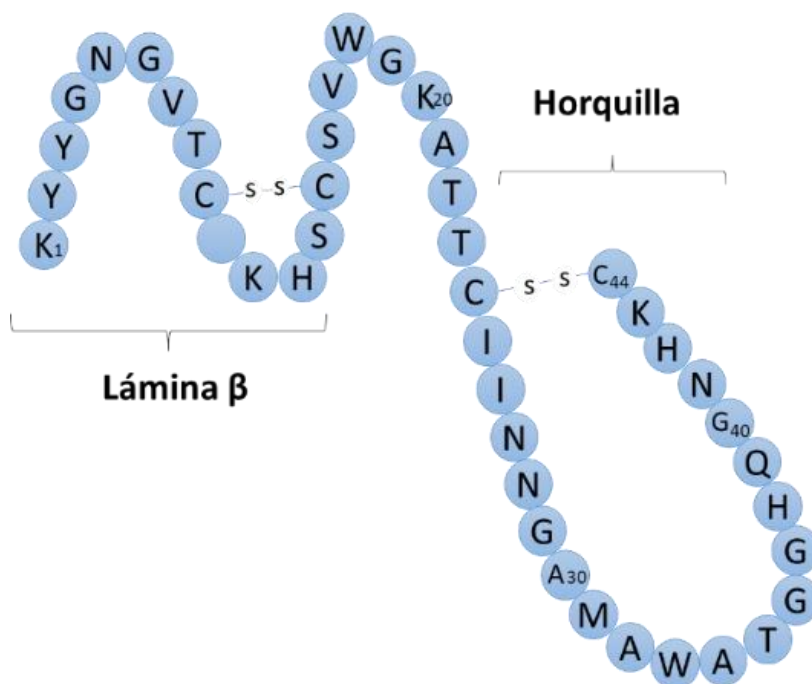


Figura 1-3 Estructura de la secuencia de aminoácidos de Pediocina PA-1. Modificado de Espitia *et al.*, (2016).

1.2.1 Biosíntesis y producción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas ocurre bajo el control del sistema denominado “quorum sensing”, en donde el estrés generado por la densidad de población produce señales que intervienen en procesos de expresión génica. Generalmente, los péptidos antimicrobianos se sintetizan como moléculas biológicamente inactivas caracterizadas por la presencia de un péptido líder (18 a 24 residuos) en la región N-terminal de la cadena. La activación de las bacteriocinas de clase II se realiza cuando estos precursores son transportados a la membrana del citoplasma, donde la secuencia líder es clivada, debido a la presencia de un sitio de procesamiento proteolítico de doble glicina (Chen y Hoover 2003), para que posteriormente sea secretada al exterior de la célula por medio de un transportador ABC.

En el caso de pediocinas, este último proceso es realizado lo más pronto posible, ya que las pre-bacteriocinas alcanzan a tener actividad antimicrobiana, que puede afectar la misma célula (Porto *et al.*, 2017).

Los genes involucrados en la producción de pediocinas están ubicados en un plásmido o en el cromosoma, dispuestos en uno o dos grupos. La expresión de las pediocinas es regulada por la presencia de tres componentes: el factor inductor (FI, feromona o factor inductor), un receptor de membrana histidina quinasa (MHK, receptor de feromona) y un regulador de respuesta (RR). El FI se expresa constitutivamente a nivel basal y es exportado al exterior de la célula por el sistema transportador ABC. Cuando existe una alta concentración de FI en el exterior estos interactúan con la MHK, lo que resulta en la autofosforilación del residuo conservado de histidina en el citoplasma. Es así como el grupo fosfato es transferido al RR y este se activa, para luego unirse a promotores de pediocina y desencadenar la expresión de genes relacionados con bacteriocinas, incluyendo los responsables de la regulación (FI, MHK y RR) (Figura 1-4). La expresión de FI actúa como un componente de retroalimentación positiva en el circuito de pediocina, permitiendo un mecanismo autorregulado (Porto *et al.*, 2017).

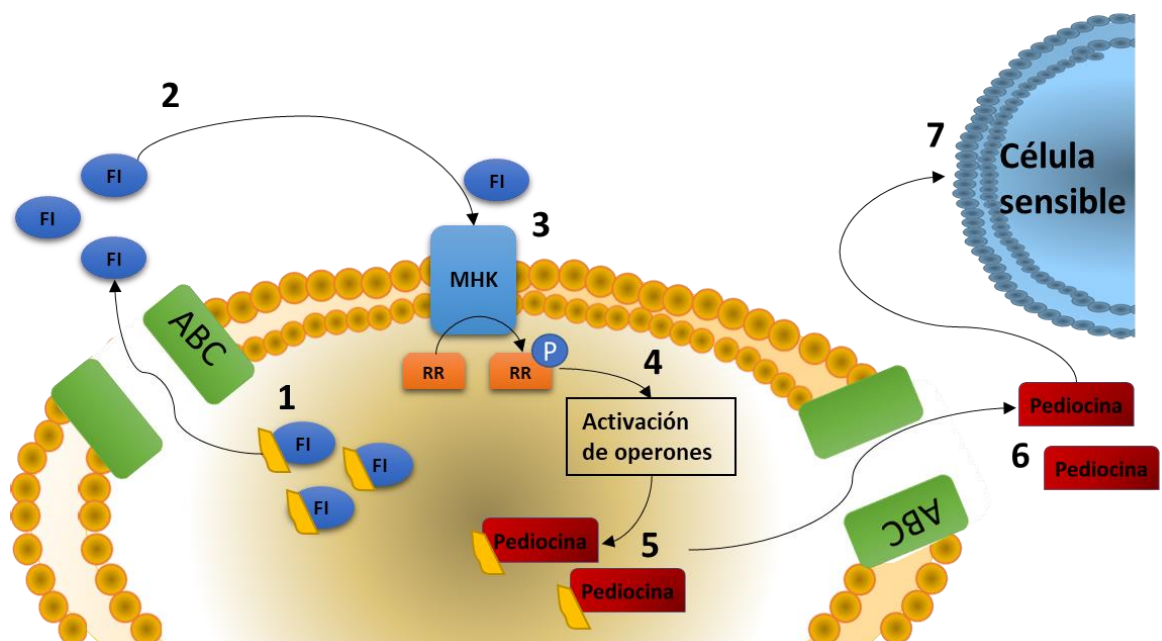


Figura 1-4 Representación de la biosíntesis de pediocinas. FI: Factor inductor, ABC: transportador ABC, MHK: Receptor de membrana histidina quinasa, RR: regulador de respuesta. Modificada de Porto *et al.* (2017).

Por otro lado, la producción de bacteriocinas se encuentra muy relacionada con la dinámica de crecimiento de las cepas productoras, es decir que depende de la fase de crecimiento en la que se encuentre (Gutiérrez-Cortés *et al.*, 2018b; Porto *et al.*, 2017). Generalmente, la producción de metabolitos de bacterias productoras de antimicrobianos se observa en etapas tempranas, tal como la fase exponencial; y esta es completada hasta el final de la misma fase y/o inicios de la fase estacionaria (Drosinos *et al.*, 2008). Por ejemplo, *P. pentosaceus* 147 alcanza su máxima actividad en la mitad de su fase exponencial y esta continua hasta 24 horas después (Gutiérrez-Cortés *et al.*, 2018a, 2018b). Otras cepas también han presentado la misma dinámica de comportamiento, donde la máxima actividad antimicrobiana se observa al inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria, siendo ejemplo de ello *P. pentosaceus* BCC3772, *P. pentosaceus* 05-10 y *P. pentosaceus* FBB61 (Porto *et al.*, 2017).

Cabe resaltar que aspectos como la concentración de nutrientes adecuados, entre ellos azúcares, nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio, y demás, son requeridos para una producción eficaz y satisfactoria de la bacteriocina (Drosinos *et al.*, 2008). Además, las condiciones ambientales, como pH y temperatura son críticas, ya que pueden tener un efecto positivo o negativo sobre algunas bacterias productoras (Drosinos *et al.*, 2008; Jack *et al.*, 1995). Frecuentemente la máxima concentración de bacteriocinas es alcanzada a un pH entre 5,5 a 6,0 con unos valores de temperatura ligeramente bajos a los óptimos para su crecimiento (Drosinos *et al.*, 2008).

1.2.2 Aplicación de bacteriocinas en sistemas alimentarios

Debido a que las bacteriocinas son herramientas potencialmente valiosas para mejorar la seguridad de los alimentos y reducir la prevalencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Deegan *et al.*, 2006), una de las aplicaciones más estudiadas es su uso como biopreservante. El término biopreservación es definido como “la extensión de la vida media y seguridad de un alimento, mediante el uso de microbiota natural, tal como BAL y/o sus componentes antimicrobianos” (Barbosa *et al.*, 2013; Ramu *et al.*, 2015).

Las características que permiten el uso de las bacteriocinas para la preservación de alimentos son i) su reconocimiento como GRAS, ii) no se consideran tóxicas o activas en células eucariotas iii) se inactivan por proteasas digestivas y tienen poca influencia en la microbiota intestinal, iv) son usualmente pH tolerantes y termotolerantes, v) tienen un relativo amplio espectro contra bacterias patógenas y de deterioro, vi) muestran un modo

de acción bactericida, mediante la formación de poros o inhibición de la expresión y producción de proteínas, vii) no hay resistencia cruzada con antibióticos y viii) sus determinantes genéticos son usualmente plásmidos codificados, lo que permite su manipulación genética (Cotter *et al.*, 2013; Gálvez *et al.* 2007).

Debido al potencial que tienen las bacteriocinas y a las características anteriormente mencionadas, diversos estudios han permitido la evaluación de estos componentes teniendo en cuenta la actividad antimicrobiana, el espectro de actividad, la estabilidad frente a otras sustancias y/o temperaturas, además de la estabilidad durante la aplicación a productos alimenticios. Uno de estos estudios, es el realizado por Cavicchioli *et al.* (2017), quienes evaluaron las bacteriocinas obtenidas de *P. pentosaceus* ST65ACC, contra 99 cepas *L. monocytogenes* y dos cepas de *L. innocua*. Los autores encontraron actividad antimicrobiana frente a las cepas estudiadas y pérdida de actividad en presencia de enzimas como proteinasa K, tripsina, pepsina, α -quimotripsina y proteasas de tipo XIV. En cuanto a la estabilidad frente a diferentes temperaturas, se encontró que entre 4 y 100 °C por 1 a 2 h o a 121 °C durante 15 min no había cambios en su actividad. En la Tabla 1-1 se muestran algunos estudios, donde se ha evaluado la actividad antimicrobiana y el efecto inhibitorio y su aplicación a algunas matrices alimentarias, utilizando cepas de *Pediococcus* spp..

Tabla 1-1 Investigaciones realizadas con bacteriocinas producidas por cepas de *Pediococcus* spp.

Investigaciones relacionadas	Autor
Evaluación de la actividad antimicrobiana de microorganismos productores de bacteriocinas como: <i>L. lactis</i> (ATCC 11454), <i>P. pentosaceus</i> (ATCC 43200 y ATCC 43201), <i>Lb. plantarum</i> (LB592 y LB75) y <i>Lb. acidophilus</i> N2 contra cepas de <i>Clostridium botulinum</i> a temperaturas de 4, 10, 15 y 30°C. Se encontró que todas las cepas, excepto <i>Lb. acidophilus</i> N2, producían zonas de inhibición y a temperaturas de refrigeración tienen acción frente a <i>C. botulinum</i> . Estos resultados sugieren su formulación en alimentos mínimamente procesados y refrigerados.	(Okereke y Montville 1991)
Evaluación del efecto de una bacteriocina producida por <i>P. acidilactici</i> contra <i>L. monocytogenes</i> y <i>C. perfringens</i> sobre carne cruda española. Las muestras de alimentos se incubaron con diferentes concentraciones de la bacteriocina a una temperatura de conservación de 15 °C y 4 °C, lo cual demostró reducción en los recuentos de <i>L. monocytogenes</i> .	(Nieto-Lozano <i>et al.</i> , 2006)

Caracterización de las bacteriocinas bacHA-6111-2 y bacHA-5692-3 producidas por *P. acidilactici* aisladas de “Alheira”, una salchicha fermentada tradicional producida en Portugal las cuales presentaron similitud con pediocina PA-1. (Albano *et al.*, 2007)

Capacidad bacteriocinogénica de *P. acidilactici* HA-6111-2 y su potencial uso para la biopreservación de salchichas de carne (“Alheira”). Los cultivos redujeron la población de *L. innocua* por debajo del límite de detección (1,5 Log). Además, no se detectó ningún microorganismo patógeno en ninguna muestra. (Albano *et al.*, 2009)

Se estudió la actividad Anti-listeria de *P. pentosaceus* BCC 3772 y su aplicación como cultivo starter para una salchicha tradicional fermentada, encontrando actividad antagonista y control del crecimiento de *L. monocytogenes* ya que la población decreció alrededor de 3,2 Log dentro de las 18 a 24 h sin comprometer la calidad del producto. (Kingcha *et al.*, 2012)

1.3 Recubrimientos comestibles

Un empaque comestible está definido como una capa delgada de un material (de proteínas, lípidos y/o polisacáridos) dispuesta sobre un alimento o componentes del mismo (Erginkaya *et al.*, 2018) que se caracterizan porque pueden ser consumidos como parte del alimento y son biodegradables (Elsabee y Abdou 2013). Dentro de las funciones que incluyen los sistemas de empaque está la extensión de la vida útil, el mejoramiento de la seguridad alimentaria y el mejoramiento de las propiedades sensoriales, mientras mantienen la calidad de un producto. Lo anterior se logra gracias a que los materiales usados protegen el alimento de factores ambientales tales como temperatura, humedad, oxígeno, enzimas, pérdida de aromas y del ataque de macro y/o microorganismos (Valdés *et al.*, 2015). Además pueden actuar como portadores de aditivos como antioxidantes, saborizantes, preservativos y antimicrobianos (Elsabee y Abdou, 2013; Erginkaya *et al.*, 2018).

En cuanto a los empaques antimicrobianos, son un tipo de empaque activo, cuyo objetivo es extender la vida media de los alimentos, mediante la reducción o inhibición del crecimiento de microorganismos que pueden estar presentes en la superficie de un producto (Johnson *et al.*, 2017). Además, este tipo de empaque puede regular la liberación gradual de los antimicrobianos hacia la superficie, por lo que puede requerir concentraciones menores para alcanzar la vida útil del alimento. Muchos materiales se han utilizado para realizar empaques comestibles, en general los biopolímeros han recibido

especial atención y dentro ellos uno de los más conocidos es el quitosano (Erginkaya *et al.*, 2018).

Por otro lado, se debe tener en cuenta que los recubrimientos comestibles tienen propiedades mecánicas tal como tensión, resistencia a la fuerza de tensión, propiedades físicas tal como permeabilidad al vapor de agua, oxígeno, sabor; y características como transparencia, color, entre otros. Estas propiedades cambian de acuerdo a la heterogeneidad de la estructura de los materiales usados, además de la adición de sustancias antimicrobianas (Erginkaya *et al.*, 2018). Es por esto que el tipo de recubrimiento que se pretenda utilizar debe acoplarse al tipo de alimento que se quiera preservar.

1.3.1 Quitosano

La quitina es el segundo biopolímero más abundante naturalmente, después de la celulosa, y se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y en la pared celular de los hongos y otros materiales biológicos. El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina por deacetilación en un medio alcalino. Consistente de unidades de β -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1-4)-2-amino-D-glucosa, y este último excede casi el 60%. Es insoluble en agua, sin embargo, es soluble en varios solventes ácidos tal como el ácido acético. Tiene excelente permeabilidad a los gases (CO_2 y O_2) y buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica es altamente permeable al vapor de agua, lo que limita su uso si se desea controlar la transferencia de humedad. Sin embargo, se han usado estrategias para mejorar sus propiedades físicas, por ejemplo, incrementando la hidrofobicidad adicionando lípidos neutros y ceras de ácidos grasos. Este compuesto es descrito en grados de deacetilación, y por su alto peso molecular y cationicidad exhibe propiedades antimicrobianas y propiedades formadoras de películas (Elsabee y Abdou, 2013; Erginkaya *et al.*, 2018).

Las propiedades antimicrobianas del quitosano son atribuidas a su naturaleza policationica. Más específicamente a las fuerzas electrostáticas entre el grupo amino protonado (NH_2) del quitosano y los residuos negativos en la superficie celular. El número de grupos NH_2 protonados incrementa a medida que aumenta el grado de deacetilación (DD). Su acción también se ha descrito como la interacción electrostática entre grupos

NH_3^+ del quitosano y los grupos fosforilados de los componentes fosfolípidicos de la membrana celular. Adicionalmente, se ha visto que a pH bajos hay menor interacción entre el quitosano y proteínas microbianas, mientras que a pH altos es mejor, en donde las moléculas de quitosano insoluble pueden precipitarse y formar capas alrededor de la célula lo que bloquea los canales, importantes para la vida celular, ya que permiten el transporte de solutos esenciales, lo que desestabiliza la célula (Elsabee y Abdou 2013).

1.4 Queso fresco tipo campesino

El queso fresco tipo campesino es definido como el producto higienizado sin madurar que después de su fabricación está listo para el consumo (Ministerio de salud, 1986). Es un producto no ácido, elaborado con leche de vaca y obtenido a partir de la coagulación enzimática de la leche mediante la acción del cuajo (ICTA, 1988; Ministerio de salud, 1986).

El queso campesino es un producto muy difundido en el territorio colombiano, ya que para su elaboración se sigue una tecnología bastante sencilla. Usualmente son elaborados por el campesino colombiano debido a la necesidad de obtener un producto con mayor tiempo de conservación en relación con la materia prima inicial (leche). La producción de este tipo de quesos está ubicada en una zona amplia del país, y sus denominaciones son de acuerdo con la zona donde se produce. Por ejemplo, las denominaciones de queso fresco y queso blanco son de acuerdo a la zonas de los departamentos de Cundinamarca y Costa atlántica, respectivamente (ICTA, 1988).

Se pueden describir dos tipos de queso: el queso campesino, el cual es fabricado bajo un molde pequeño y puede ser o no prensado; el queso prensado posee una a presentación en bloque bastante grande en donde se prensa la cuajada por un periodo de 24 a 36 horas. Los quesos campesino y prensado tienen respectivamente en promedio las siguientes características, 70,95 y 65,57% de humedad del queso desgrasado, 49,34 y 45,60% de materia grasa en base seca; por lo que se pueden clasificar como quesos blandos a semiblandos, de alto contenido de materia grasa (ICTA, 1988). Su vida útil, según la Resolución 02310 de 1986 del Ministerio de Salud, es de 18 a 30 días para productos refrigerados en empaque hermético o empaque al vacío, respectivamente (Ministerio de salud, 1986). Las características microbiológicas de este producto se ven establecidas en la resolución 01804 de 1989 del Ministerio de Salud y la Norma Técnica Colombiana 5894, referidos a recuentos de coliformes totales y fecales, *Salmonella* spp., *S. aureus* coagulasa

positiva, *L. monocytogenes*, mohos y levaduras, como se observa en la Tabla 1-2 (INVIMA, 1989).

Tabla 1-2 Características microbiológicas del queso. n: número de muestras a examinar; índice máximo permisible para indicar nivel de buena calidad; M: índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable; c: número máximo de muestras permisibles entre m y M (INVIMA, 1989).

Parámetros	n	m	M	c
NPM coliformes fecales/g	3	<100	-	0
Mohos y levaduras/g	3	100	500	1
Staphylococcus coagulasa positiva/g	3	1.000	3.000	1
Salmonella/25g	3	0	-	0
Listeria monocytogenes	0	0	0	0

Es importante resaltar que uno de los principales riesgos biológicos considerados por los productores de queso y por su impacto en la industria alimentaria y en la salud de los consumidores, es la presencia de *L. monocytogenes*. Si bien este microorganismo es sensible a la pasteurización, la presencia puede deberse a la contaminación de la leche durante el ordeño, durante almacenamiento en tanques de granel o de forma común después de la producción, durante el transporte (Melo *et al.*, 2015). De igual modo, existen otros microorganismos que pueden generar degradación del queso, por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudomonas* sp. y *Penicillium* spp. y algunos otros psicrófilos que pueden sobrevivir a temperaturas de refrigeración (Ledenbach y Marshall 2009; Pintado *et al.*, 2010).

1.4.1 Estudio de bacteriocinas sobre diferentes tipos de queso

Existen numerosos estudios de aplicaciones de bacteriocinas sobre diferentes tipos de quesos, los cuales se han enfocado en el control de microorganismos patógenos y de deterioro presentes; dentro de los cuales se encuentra el estudio realizado por Pintado, *et al.* (2010) quienes evaluaron el efecto inhibidor de nisina, natamicina y ácido málico, incorporados en películas comestibles de proteína de suero. Dicho estudio reportó además de la actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes*, *Ps. aeruginosa*, *Y. lipolytica*, *P.*

commune y *P. chrysogenum*, la estabilidad de la película cuando entró en contacto con las sustancias antimicrobianas.

En otro estudio realizado por Ferrari *et al.* (2016), obtuvieron BAL a partir de productos lácteos de cabra y fueron inoculados en queso artesanal para inhibir *S. tify*, encontrando una disminución de 0,38 log UFC/g de estas bacterias. Bockelmann *et al.* (2017), aplicaron *S. equorum* a concentraciones de 10^6 UFC/cm² en queso, consiguiendo una inhibición completa del crecimiento de *L. monocytogenes* cuando se inoculó a una concentración de 10^5 UFC/cm².

Bacteriocinas de *P. pentosaceus* han sido evaluadas también en queso encontrando que a diferentes concentraciones puede inhibir *L. monocytogenes* como el caso de Mahdi, Al, y Zwain (2015) quienes observaron la disminución de una población de 5,7 UFC/mL del patógeno en queso a 1,5 UFC/mL.

Otro de los campos de la aplicación de las bacteriocinas en alimentos, está relacionado con la extensión de la vida útil de productos. Settanni *et al.* (2011) evaluaron cepas de *Lb. Paracasei*, *Lb. Rhamnosus* y *Streptococcus macedonicus*, aisladas de queso “Nostrano di Primiero”, para extender la vida útil de queso fresco italiano “Tosèla”, la cual es normalmente de 3 días. La aplicación de las cepas bacteriocinogénicas permitió una disminución en la concentración de microorganismos patógenos y ausencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella* durante 7 días.

En otro estudio realizado por Martins *et al.* (2010), se evaluó la extensión de la vida media de queso Ricotta, utilizando recubrimientos de galactomananos con incorporación de nisina, contra *L. monocytogenes*. Tres tratamientos diferentes se probaron en el queso: muestras sin recubrimiento, con recubrimiento sin nisina y con recubrimiento con nisina y el queso fue inoculado con el microorganismo. De los análisis realizados por 28 días se encontró que hubo una reducción en el recuento de *L. monocytogenes* de 5,1 a 4,4 log UFC/g en los dos primeros días de conservación del queso con recubrimiento con nisina, y su acción podía extenderse hasta por 7 días de conservación.

En la Tabla 1-3 se puede apreciar un resumen de los estudios realizados en quesos frescos y madurados, para el control de microorganismos, en especial *L. monocytogenes*, usando estrategias como la aplicación de bacteriocinas y/o recubrimientos y películas comestibles. En esta tabla además se describen algunas de las condiciones en que fueron almacenados

los quesos, la forma de aplicación de los agentes antimicrobianos, así como la forma de inoculación del microorganismo a evaluar.

De lo mencionado hasta aquí se puede observar que existe un gran potencial para el uso de bacteriocinas sobre queso tipo fresco y/o madurado para el control de microorganismos patógenos, en especial *L. monocytogenes*. La aplicación de estas bacteriocinas puede ser de forma directa o a través de recubrimientos y/o películas comestibles que pueden servir como una barrera adicional para el control del alimento. Estos extensos hallazgos demuestran que se debe seguir profundizando en el uso de bacteriocinas sobre este tipo de productos, que por su gran consumo tendrían un impacto positivo para la preservación de alimentos.

Tabla 1-3 Estudios realizados en quesos para el control de crecimiento microorganismos de deterioro y/o patógenos.

Tipo de queso	Metodología de aplicación bacteriocina	Inóculo	Tratamientos y tipo de recubrimiento	Conservación y tiempo de evaluación	Resultados	Ref.
Cottage (Fresco)	Inoculo de cepa productora de bacteriocinas.	<i>L. monocytogenes</i> : Inoculación durante la producción del queso. Concentración: 10^3 UFC/mL	No aplica.	4 °C Días: 0, 1, 2, 3, 5, 7	La aplicación de cuatro cepas bacteriogénicas de <i>Lact. Lactis</i> , como cultivos iniciadores en la producción del queso, que además producen nisina A y lactacina, controló el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> . Una de las cepas alcanzó a reducir hasta 3 Log UFC/mL durante las primeras 6 horas de incubación.	(Dal <i>et al.</i> , 2012)
Ricotta (Fresco)	Solución de nisina - 10000 UI/mL.	<i>L. monocytogenes</i> : Inoculación de 50 µL en la superficie del queso, después de la aplicación del recubrimiento. Concentración: 10^6 UFC/mL	C. Queso sin recubrimiento; NO. queso con recubrimiento de galactomanano sin nisina; N: con recubrimiento de galactomanano con nisina. Aplicación: Inmersión por 30 s en la solución.	4 °C Días: 0, 2, 7, 14, 21, 28	Recubrimientos comestibles de galactomanano, incorporando nisina, previno el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> durante los primeros siete días de almacenamiento comparados con el control y las muestras que solo tenían recubrimiento sin nisina.	(Martins <i>et al.</i> , 2010)
Por salut (Fresco)	Natamicina y nisina	<i>S. cerevisiae</i> y <i>L. innocua</i> : a) Inoculación de 10µL en la superficie del queso, <u>antes</u> de poner la película comestible. b) Inoculación de 10µL en la superficie del queso, <u>después</u> de poner la película comestible. Concentración: 10^4 UFC/mL	A. 20µL de la bacteriocina extendida en la superficie del queso; B. Películas de almidón de tapioca recortadas y puestas en la superficie del queso.	4 °C Horas: 192	El recubrimiento inhibió el crecimiento de mohos y levaduras (<10 UFC/mL), además controló el crecimiento de bacterias psicrótrofas. Adicionalmente inhibió el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> y no presentó crecimiento de <i>L. innocua</i> , es decir que hubo un efecto bactericida.	(Ollé Resa <i>et al.</i> , 2016)
Por salut (Fresco)	Natamicina y nisina	<i>S. cerevisiae</i> y <i>L. innocua</i> : a) Inoculación de 10µL en la superficie del queso, <u>antes</u> de poner la película comestible. b) Inoculación de 10µL en la superficie del queso, <u>después</u> de poner la película comestible. Concentración: 10^6 UFC/mL	CNA- Película con natamicina; NI , película con nisina; NANI , Película con nisina y natamicina Película recortada y puesta en el queso.	4 °C Horas: 192	Recubrimientos con natamicina y nisina disminuyeron el recuento inicial 2 Log y <i>S. cerevisiae</i> 1.5 Log por debajo del control. Nantamicina y nisina aplicadas directamente también tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de <i>L. innocua</i> . Y películas de natamicina mostro efecto bacteriostático.	(Ollé Resa <i>et al.</i> , 2014)
Mongolian (Fresco)		No usaron inóculo	Solución de almidón y quitosano aplicado con brocha en la superficie.	4 °C Días: 0, 15, 30	La aplicación de las películas de quitosano y almidón, controlaron la población microbiológica de forma efectiva. Los recuentos de bacterias totales y hongos fueron menores con respecto al queso sin película comestible.	(Mei, <i>et al.</i> 2013a)
Cottage (Fresco)	Extracto crudo filtrado de enterocina 416k1.	<i>L. monocytogenes</i> : Inoculación por inmersión del queso en una suspensión antes de la adición de la película. Concentración: 10^8 UFC/mL	Películas de polietileno	4 °C y 22 °C Días: 0, 1, 4, 7, 14, 28	El recuento de <i>L. monocytogenes</i> disminuyó 1,0 Log comparado con el control en el día 28, cuando el queso fue almacenado a 4 °C. Por otro lado, cuando se manejó una temperatura de 22 °C hubo una disminución de 0,5 Log.	(Iseppi <i>et al.</i> , 2008)
Cheddar (Madurado)	Liposomas de Nisina-sílica	<i>L. monocytogenes</i> : Inoculado con 1% (v/v) de una suspensión antes de la adición del recubrimiento	A. Recubrimientos de quitosano; B. recubrimiento de quitosano con liposomas de nisina; C.	4°C, Días: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14	Para los tratamientos con liposomas de nisina aplicados directamente, a 25 °C, se observó que el número de bacterias viables incrementó gradualmente. Mientras que <i>L.</i>	(Cui <i>et al.</i> , 2016)

Concentración: 10 ³ UFC/mL			recubrimiento de quitosano con liposomas de nisina-silica	25°C, Días: 0, 1, 2, 3, 5, 7	<i>monocytogenes</i> disminuyó el crecimiento 1,49 Log UFC/g al quinto día, cuando fue tratado con recubrimientos de quitosano que contenían liposomas de nisina.	
Gobek kashar (Madurado)	No aplica.	No aplica.	C1. control sin recubrimiento ni aceite esencial; C2 con recubrimiento de quitosano; C3 con recubrimiento y aceite de pescado 0,8%; C4 con recubrimiento y aceite al 1%. El queso fue sumergido por 60 segundos.	Días: 3, 30, 60, 90	Películas de quitosano enriquecidas con aceites esenciales mostró que afecta significativamente el decrecimiento de mohos en 1,15 Log UFC/g.	(Yangilar, 2016)
Queso tipo fresco	Nisina y ácido caprílico directamente sobre el queso	<i>L. monocytogenes</i> : 2L cepa fue inoculada en 2,3 kg de queso. Concentración: 10 ⁴ UFC/mL	No aplica.	4 °C Días: 0,5,10,15,20,25	Todas las combinaciones de nisina y ácido caprílico tuvieron efectividad frente a <i>L. monocytogenes</i> . Se observó que se redujo el recuento alrededor de 3 Lo UFC/g después de dos días de almacenamiento, comparado con el control.	(Gadotti <i>et al.</i> , 2014)

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el antagonismo de bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147 y quitosano en recubrimientos comestibles frente a *Listeria monocytogenes* en queso campesino.

1.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de la bacteriocina de *Pediococcus pentosaceus* 147 frente a *Listeria monocytogenes*.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de películas comestibles que contienen bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147 y quitosano.
- Estudiar el efecto de la película comestible durante el periodo de almacenamiento del queso campesino frente a *Listeria monocytogenes*.

1.6 Referencias

- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., ... Teixeira, P. (2009). Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20(8), 764–770. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.021>
- Albano, H., Todorov, S. D., van Reenen, C. A., Hogg, T., Dicks, L. M. T., & Teixeira, P. (2007). Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 239–247. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.011>
- Aloui, H., & Khwaldia, K. (2016). Natural Antimicrobial Edible Coatings for Microbial Safety and Food Quality Enhancement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1080–1103. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12226>
- Barbosa, A. A. T., Silva de Araújo, H. G., Matos, P. N., Carnelossi, M. A. G., & Almeida de Castro, A. (2013). Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2–3), 135–140. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.004>
- Bockelmann, W., Koslowsky, M., Goerges, S., Scherer, S., Franz, C. M. A. P., & Heller, K. J. (2017). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. *Food Control*, 71, 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.019>
- Bruno, M. E. C., & Montville, T. J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 3003–3010.
- Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2017). Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with anti-

listerial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. *Journal of dairy science*, 1–10.
<http://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>

Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). *Bacteriocins and their Food Applications*. comprehensive reviews in food science and food safety, 2.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology*, 3(10), 765–776. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1240>

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), 95–105. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2937>

Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8598–8606.
<http://doi.org/10.3168/jds.2016-11658>

Dal, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 58–65. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016>

Dalton, J., & Hill, C. (2011). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Deegan, L. H., Cotter, P. D., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058–1071.
<http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>

Drosinos, E. H., Mataragas, M., & Paramithiotis, S. (2008). Antimicrobial activity of bacteriocins and their applications. *Meat Biotechnology*, 375–397.
http://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5_17

Eds, D. R. (2011). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. (D. Drider & S. Rebuffat, Eds.) *Natural History*. New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5>

Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C*, 33(4), 1819–1841.
<http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>

Erginkaya, Z., Kalkan, S., & Unal, E. (2018). Use of Antimicrobial Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Food Safety. Dairy Industries International (Vol. 83). <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1378-7>

Espitia, P. J. P., Otoni, C. G., & Soares, N. F. F. (2016). Pediocin Applications in Antimicrobial Food Packaging Systems. Antimicrobial Food Packaging. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00036-X>

Fallis, A. . (2013). Food Microbiology Protocols. (J. F. Spencer & A. L. Ragout, Eds.)Journal of Chemical Information and Modeling (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Favaro, L., Barretto Penna, A. L., & Todorov, S. D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation? Trends in Food Science and Technology, 41(1), 37–48. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>

FDA. (2016). Compliance Policy Guides - CPG Sec. 555.320 *Listeria monocytogenes*. Recuperado el 16 de abril de 2017, a partir de <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm>

Ferrari, I. da S., de Souza, J. V., Ramos, C. L., da Costa, M. M., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. Food Microbiology, 60, 29–38. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014>

Gadotti, C., Nelson, L., & Diez-Gonzalez, F. (2014). Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. Food Microbiology, 39, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.007>

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 120(1–2), 51–70. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>

Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Food Biopreservation. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7_1

Grande, M. J., Lucas, R., Valdivia, E., Abriquel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., ... Gálvez, A. (2005). Stability of Enterocin AS-48 in Fruit and Vegetable Juices. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2085–2094. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2085>

Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., & Coglianò, V. (2006). Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology*, 7(8), 628–629. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70789-6](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70789-6)

Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018a). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. *Annals of Microbiology*, 68(6), 383–398. <http://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>

Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018b). Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02952>

IARC International Agency for Research on Cancer. (2010). Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. International Agency for Research on Cancer, 94. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326541/>

ICTA. (1988). Manual de elaboración de queso campesino y prensado.

INVIMA. (1989). Resolución 01804, 67(02310), 9.

Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., ... Bondi, M. (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 281–287. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015>

Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), 171–200.

Johnson, E. M., Jung, D. Y.-G., Jin, D. Y.-Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., & Suh, J. W. (2017). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(September), 1–25. <http://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>

Kazakov, T., Kristiansen, P. E., Kuipers, A., Kuipers, O. P., Lucas, R., Martin-Visscher, L. A., ... Zendo, T. (2011). Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications. (D. Drider & S. Rebuffat, Eds.). Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/9781441976976925>

Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Chareonpornsook, K., ... Visessanguan, W. (2012). Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. Food Control, 25(1), 190–196. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.005>

Kuo, Y. C., Liu, C. F., Lin, J. F., Li, A. C., Lo, T. C., & Lin, T. H. (2013). Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(1), 237–246. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4149-2>

Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. (W. H. Sperber & M. P. Doyle, Eds.). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1>

Mahdi, L., Al, S., & Zwain, L. (2015). The Effect of *Pediococcus pentosaceus* Bacteriocin on *Listeria monocytogenes* in Soft Cheese. International Conference on Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical and Food Sciences. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.15242/IICBE.C0615069>

Malheiros, P. da S., Sant'Anna, V., Barbosa, M. de S., Brandelli, A., & Franco, B. D. G. de M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. International Journal of Food Microbiology, 156(3), 272–277. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004>

Malik, A., Alves, M., & Grohmann, E. (2014). Management of microbial resources in the environment. Management of Microbial Resources in the Environment, 1–530. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2>

Marques, J. de L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruxen, C. E. dos S., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., ... Silva, W. P. da. (2017). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria*

monocytogenes in cheese. Food Microbiology, 63, 159–163. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carmo Avides, M. D. O., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(3), 1884–1891. <http://doi.org/10.1021/jf902774z>

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. International Journal of Biological Macromolecules, 57, 17–21. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>

Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. Food Research International, 67, 75–90. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>

Ministerio de salud. Resolución número 02310 de 1986, Pub. L. No. 02310 de 1986 (1986). <http://doi.org/10.1080/0161-118691860912>

Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Ant. van Leeuwenhoek, 76, 185–198.

Muhialdin, B. J., Hassan, Z., & Saari, N. (2013). Lactic acid bacteria in biopreservation and the enhancement of the functional quality of bread. Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes, (September), 155–172. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1909.5760>

Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. D. C., & De La Torre, A. H. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. Meat Science, 72(1), 57–61. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.06.004>

Okereke, A., & Montville, T. J. (1991). Bacteriocin-Mediated Inhibition of *Clostridium botulinum* Spores by Lactic-Acid Bacteria at Refrigeration and Abuse Temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 57(12), 3423–3428. Recuperado a partir de si

Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 44, 146–151. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.054>

Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2016). Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. *Food Control*, 59, 737–742. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.056>

Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S3. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>

Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240–246. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.017>

Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. P. S. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361–374. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>

Ramu, R., Shirahatti, P. S., Devi, A. T., Prasad, A., J, K., M, S. L., ... M, N. N. (2015). Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 8398(March 2016), 0. <http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1020918>

Salar, R. K., Siwach, P., Gahlawat, S. K., & Duhan, J. S. (2013). Biotechnology: Prospects and applications. *Biotechnology: Prospects and Applications*, 9788132216, 1–315. <http://doi.org/10.1007/978-81-322-1683-4>

Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 123–138. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>

Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Cocconcelli, P. S., & Poznanski, E. (2011). Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(5), 883–890. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.003>

Sistema Nacional de Salud y Ministerio de Protección Social. (2011). Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. INS, Ministerio de Salud y Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud.

Suárez, H., De Francisco, A., & Beirao, L. (2008). Influencia de Bacteriocinas Producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 Sobre la Vida Útil de Filetes del Híbrido de Cachama *Piaractus brachipomus* x *Colossoma macropomum* Empacado al Vacío. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 15(1), 32–40.

Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. (2015). Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. Coatings, 5(4), 865–886. <http://doi.org/10.3390/coatings5040865>

Vásquez M, S. M., Suárez M, H., & Montoya, O. I. (2009). Evaluation of bacteriocins as protective means for the biopreservation of refrigerated meat. Revista chilena de nutrición órgano oficial de la Sociedad Chilena de Nutrición Bromatología y Toxicología, 36(3), 228–238. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182009000300005>

Viana de Souza, J., & Silva Dias, F. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. Current Opinion in Food Science, 13, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.003>

Winkelströter, L. K., Tulini, F. L., & De Martinis, E. C. P. (2015). Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. LWT - Food Science and Technology, 64(2), 586–592. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>

Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwathana, A., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Science, 120, 118–132. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>

Yangilar, F. (2016). Effect of the Fish Oil Fortified Chitosan Edible Film on Microbiological, Chemical Composition and Sensory Properties of Göbek Kashar Cheese during Ripening Time. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 36(3), 377–388. <http://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.3.377>

2. Capítulo II. Caracterización de la actividad antimicrobiana y cuantificación de la bacteriocina de *Pediococcus pentosaceus* 147 frente a *Listeria monocytogenes* in vitro

Resumen

Las bacteriocinas son péptidos que por su actividad antagónica frente a microorganismos patógenos y causantes de deterioro han sido de gran interés. *Pediococcus pentosaceus* 147 es una Bacteria ácido-láctica (BAL) capaz de producir agentes antimicrobianos. Las bacteriocinas producidas por este microorganismo han sido evaluadas previamente; sin embargo, en este estudio se continua la caracterización mediante el análisis de la actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria y cuantificación de proteína total. Los hallazgos mostraron halos de inhibición de un tamaño de $16,67 \pm 0,58$ mm frente a una cepa indicadora de *L. monocytogenes* con una actividad antimicrobiana de 8533,33 UA/mL y una concentración de proteína total de 182,89 μ g/mL. Adicionalmente, se determinó la CMI con un valor de 5,72 μ g/mL.

2.1 Introducción

Las BAL son microorganismos utilizados comúnmente en la industria de alimentos para la preservación y mejoramiento de características sensoriales como textura y sabor, además de mejorar la vida útil de un producto (Porto *et al.*, 2017). La producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas, es considerada una herramienta muy útil en biopreservación mediada por BAL (Settanni y Corsetti, 2008). Especies pertenecientes al género *Pediococcus* spp. son conocidos por su capacidad para reducir el crecimiento de bacterias Gram positivas, especialmente de *L. monocytogenes* (Cavicchioli *et al.*, 2018; Porto *et al.*, 2017); es por ello que la identificación y caracterización de las bacteriocinas

producidas por este género ha ganado particular importancia en los últimos años en la industria alimentaria.

La mayoría de *Pediococcus* spp. son encontrados en alimentos. Son un grupo importante de bacterias iniciadoras que sirven para la producción de productos fermentados, o son utilizadas para la producción de bacteriocinas, mediante el uso de cepas como *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* (Stiles y Holzapfel, 1997). *P. pentosaceus* son cocos Gram positivos que usualmente se agrupan en tétradas, son anaerobios facultativos, catalasa negativa y homofermentativos (Porto *et al.*, 2017). Algunas cepas de *P. pentosaceus* han mostrado actividad bacteriocinogénica, dentro de las cuales están *P. pentosaceus* KJBC11 (Sadishkumar y Jeevaratnam, 2017), *P. pentosaceus* NKSM1 (Kumar *et al.*, 2018), *P. pentosaceus* ATCC 43200 (De Souza *et al.*, 2018), *P. pentosaceus* LBB44 (Kaur y Tiwari, 2018), *P. pentosaceus* ST65ACC (Cavicchioli *et al.*, 2018), entre otras.

Gutiérrez-Cortés *et al.* (2018) aislaron la cepa bacteriocinogénica *P. pentosaceus* 147 obtenida a partir de queso artesanal en el estado de Minas Gerais (Brasil). La cepa y sus bacteriocinas fueron caracterizadas, encontrando una actividad antimicrobiana de 51.200 UA/mL frente a *L. monocytogenes*. Se reportó que estas bacteriocinas presentan actividad en un amplio rango de temperaturas, inclusive cuando son expuestas a tratamientos de 121°C hasta por 20 minutos; y presentan estabilidad a rangos de pH entre 4 y 8. Tras precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación, y una separación por cromatografía presentó una actividad de 25.600 UA/mL y su peso molecular se reportó entre 3,5 y 6,5 KDa.

En el presente capítulo se muestra el estudio de actividad y cuantificación de las bacteriocinas producidas por *P. pentosaceus* 147. Para ello se realizó la purificación parcial por medio de precipitación con sulfato de amonio y se evaluó la fracción más adecuada para su uso en posteriores ensayos. Luego, se evaluó la actividad antimicrobiana, se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford y se determinó la CMI para su aplicación posterior.

2.2 Metodología

2.2.1 Cepas bacterianas y condiciones del cultivo

La cepa productora de bacteriocinas, *P. pentosaceus* 147, aislada a partir del queso artesanal Minas (Brasil), fue utilizada en este estudio debido a que ha demostrado su actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* (Gutiérrez-Cortés *et al.*, 2018a). El stock del cultivo se conservó en caldo De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, BD Difco, Sparks, MD, USA) suplementado con 30% (v/v) de glicerol a -20°C. Por otro lado, *L. monocytogenes* ATCC 7644 fue utilizada como cepa indicadora y patogénica, para la evaluación de la actividad antimicrobiana. Esta cepa se conservó en caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid™) a -20°C y suplementado con 30% (v/v) de glicerol.

2.2.2 Obtención del Sobrenadante Libre de Células (SLC) a partir de cepas de *Pediococcus pentosaceus* 147

Para la obtención del sobrenadante libre en células (SLC), también llamado extracto crudo, se siguió la metodología de Gutiérrez-Cortés *et al.*, (2018). Para ello se tomó 1 Litro de caldo MRS y se realizó un inóculo de 1% (v/v) de la cepa de *P. pentosaceus* 147 previamente incubada durante toda la noche; esto se llevó a una temperatura de 37°C por 24 h. El SLC se obtuvo por centrifugación a 10.000 $\times g$ durante 10 min a 4°C del caldo previamente incubado, posteriormente se ajustó el pH a 6,0–6,5 con NaOH 1M. Finalmente y con el fin de desnaturalizar proteasas extracelulares y sustancias como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) el extracto crudo se trató a 80°C por 10 minutos (Cavicchioli *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2017). Este procedimiento se realizó por triplicado.

2.2.3 Purificación parcial de la bacteriocina

La purificación parcial de la bacteriocina de *P. pentosaceus* 147 se realizó a partir del SLC obtenido, de acuerdo al procedimiento de Kumari *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Inicialmente, se tomó el SLC y se le adicionó lentamente sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 60%, 70% y 80% de saturación manteniendo una temperatura constante de 4°C. Una vez realizado este paso, esto se almacenó por 24 h a la misma temperatura. Después de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10.000 $\times g$ por 30 minutos a 4°C y el precipitado se

recolectó y disolvió en buffer fosfato de sodio 0,05M (pH 7,0). Posteriormente, la solución de bacteriocinas se dializó utilizando el mismo buffer durante 24 h mediante una membrada de celulosa (Spectra/Por®, 1000 Da MWCO, Fisher Scientific Pittsburgh, PA USA).

2.2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en agar por pozos, usando como indicador la cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644. Inicialmente, se verificó la actividad antimicrobiana de las cepas almacenadas a -20°C mediante la inoculación en 10 mL de caldo MRS e incubación a 37°C por 24 horas para la obtención del SLC; posteriormente se siguió el procedimiento descrito a continuación. En primer lugar, se realizaron diluciones seriadas de ½ del SLC con agua destilada estéril; posteriormente, se tomaron 30 µL de cada dilución y se depositaron en pozos de 5 mm realizados en agar BHI al 1% (p/v), el cual fue previamente inoculado con la cepa indicadora a una concentración de 10⁴ UFC/mL. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Para su lectura se tuvo en cuenta que una zona de inhibición de por lo menos 2 mm de diámetro es considerada positiva (Hwanhlem *et al.*, 2017). Para la lectura del diámetro de los halos se utilizó el software Image J, y como control positivo se utilizó Nisina (CIMPA S.A).

Adicionalmente, la actividad se expresó en Unidades Arbitrarias por mL (UA/mL) usando la Ecuación (2.1), donde el título se definió como 2ⁿ, siendo *n* la dilución más alta que mostró una zona clara de inhibición de por lo menos 2 mm del microorganismo indicador; y *v*, el volumen del SLC utilizado (Apolônio *et al.*, 2007). Este procedimiento se realizó por triplicado.

$$UA\ ml^{-1} = 2^n \frac{1000\ \mu l}{v} \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

2.2.5 Cuantificación proteínas totales por el método de Bradford

La determinación cuantitativa de proteínas totales de las fracciones obtenidas a partir del SLC se realizó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). Para esto se preparó el reactivo de Bradford a una concentración final de 0,01% de azul de Coomassie brillante G-250, etanol al 4,7% (v/v) y ácido fosfórico al 8,5% (v/v); se realizó una curva de calibración usando albumina de suero bovino (BSA), como estándar en un rango de 0 a 1

mg/mL de proteína, esto permitió la obtención de la ecuación de regresión lineal para cuantificar la concentración de proteínas totales. Posteriormente, se tomaron 20 µL de la fracción de análisis (SLC y/o precipitados obtenidos después de purificación parcial con sulfato de amonio) y se aplicaron a 980 µL del reactivo de Bradford, luego se agitó y realizó la lectura a 525 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S Uv-Vis después de 5 minutos y/o antes de 1 h. Las lecturas para este ensayo se realizaron por triplicado.

Finalmente, con los resultados obtenidos en los numerales 2.2.3, 2.2.4 y 2.2.5 se realizó una tabla sintética de purificación en la cual se integraron los resultados obtenidos y se utilizaron las ecuaciones Ecuación (2.2), Ecuación (2.3), Ecuación (2.4) y Ecuación (2.5) (Katharopoulos *et al.*, 2016).

$$\text{Actividad total (UA)} = \text{Actividad antimicrobiana} \times \text{vol. total} \quad \text{Ecuación (2.2)}$$

$$\text{Actividad específica } \left(\frac{\text{UA}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Actividad antimicrobiana}}{\text{Concentración de proteína total}} \quad \text{Ecuación (2.3)}$$

$$\text{veces de purificación} = \frac{\text{Actividad específica cada etapa}}{\text{Actividad específica etapa inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación (2.4)}$$

$$\text{Rendimiento total (\%)} = \frac{\text{Actividad total en cada etapa}}{\text{Actividad total etapa inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación (2.5)}$$

2.2.6 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Con el fin de determinar la CMI del SLC se utilizaron dos metodologías. La primera fue la de difusión en agar por pozos, realizado de acuerdo al procedimiento planteado en el numeral 2.2.4, donde la CMI se definió como la concentración más baja del SLC que mostró un halo de inhibición con un diámetro mayor a 2 mm, después de 24 h de inhibición (Goulhen *et al.*, 1998). En segunda instancia, se utilizó la metodología de macrodilución en caldo de acuerdo con lo descrito por Kana y Meimandipour (2017) con algunas modificaciones. Se prepararon tubos de 1 mL de caldo BHI y se adicionó 1 mL del SLC, obtenido previamente de acuerdo con el procedimiento 2.2.2, al primer tubo. A partir de este tubo se realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{2}$, hasta llegar a un total de 10 diluciones, es decir hasta una concentración de 1/1024. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 10 µL de una suspensión de 10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644. Se realizaron tres controles: 1. control del medio (caldo BHI), 2. control de esterilidad del SLC (caldo BHI

más SLC), 3. control de crecimiento del microorganismo indicador (caldo BHI más inóculo). En esta metodología, la CMI se definió como la concentración más baja del SLC en la cual no se observó crecimiento bacteriano. La determinación de CMI utilizando las dos metodologías se realizó por triplicado.

2.3 Resultados y discusión

Inicialmente y con el objetivo de disminuir la variabilidad y estandarizar las técnicas utilizadas, se decidió trabajar con repiques de *P. pentosaceus* 147 de pase número 2 obtenidas a partir de la cepa original. Para ello se creó un stock de 50 viales y se hizo el recuento para estandarizar la concentración de la biomasa en unidades formadoras de colonia (UFC) por vial. Este mismo procedimiento se realizó para la cepa indicadora de *L. monocytogenes* ATCC 7644. En la Tabla 2-1 se observa el recuento de colonias por vial.

Tabla 2-1 Recuento bacteriano cepas bacterianas conservadas a -20°C.

Cepa bacteriana	Recuento total (UFC/mL)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 147	$1,82 \times 10^8$
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	$1,74 \times 10^7$

Antes de iniciar los ensayos, la viabilidad y actividad antimicrobiana de las cepas de *P. pentosaceus* 147 conservadas a -20°C contra la cepa indicadora se confirmó siguiendo el procedimiento del numeral 2.2.4. Los resultados de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* y la formación de halos de inhibición (diámetro de 15 mm) se pueden observar en el Anexo A.

2.3.1 Purificación parcial de la bacteriocina de *P. pentosaceus* 147

Para la evaluación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147, se realizó la estandarización de la purificación parcial de bacteriocinas que permitió seleccionar la fracción más adecuada con un efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes*. Se realizó la purificación parcial con sulfato de amonio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como se describe en el numeral 2.2.3, posteriormente se determinó la actividad antimicrobiana y la concentración de proteínas totales tanto del SLC y los precipitados obtenidos, como se observa en la

Figura 2-1. Los resultados obtenidos fueron utilizados para realizar la tabla de purificación parcial de la bacteriocina (Tabla 2-4).

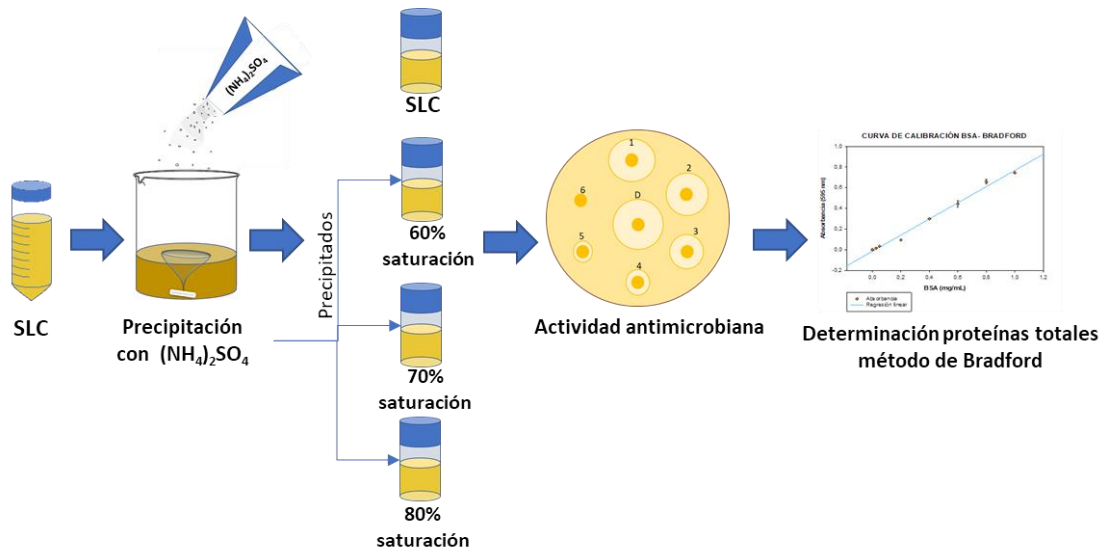


Figura 2-1 Diagrama de flujo del proceso de purificación parcial de bacteriocinas producidas por *P. pentosaceus* 147.

2.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

En la Figura 2-2 se puede apreciar el montaje de la evaluación de la actividad antimicrobiana. Cabe aclarar que el control utilizado para este ensayo fue nisina a una concentración de 500 UI/m (12,5mg/mL), concentración aceptada por según la FAO/OMS Codex para la aplicación en queso (Ross *et al.*, 2002). Es pertinente mencionar que los sobrenadantes obtenidos después de la precipitación no presentaron actividad antimicrobiana, por lo que se infirió que la precipitación parcial de la bacteriocina fue exitosa.

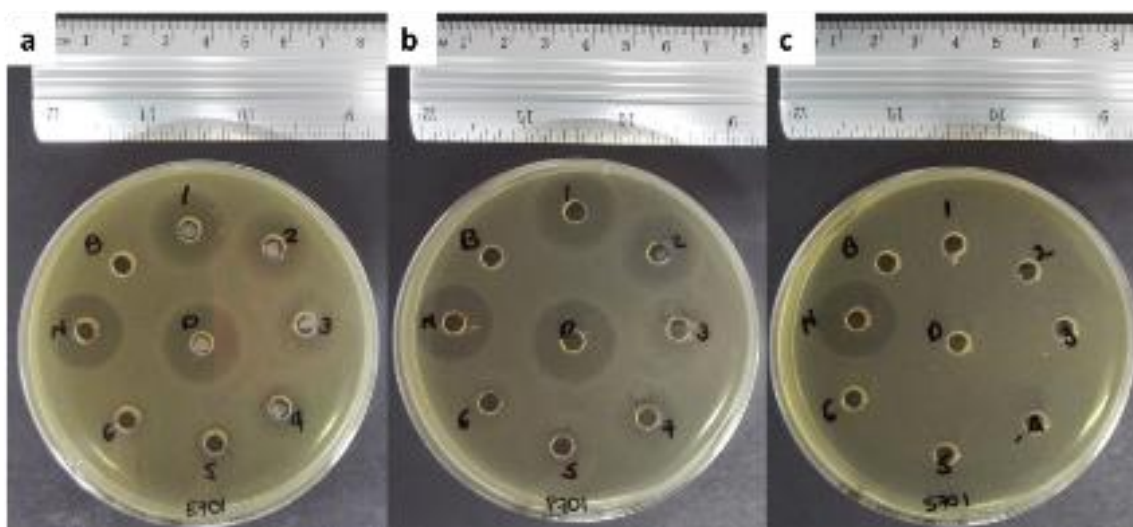


Figura 2-2 Halos de inhibición de las fracciones obtenidas durante la precipitación con sulfato de amonio. En esta figura se pueden apreciar los halos de inhibición, formados a partir de diluciones seriadas de a) SLC, b) Precipitado con 70% de saturación de sulfato de amonio, c) Sobrenadante obtenido a partir de la precipitación al 70% de saturación. N (nisina): control positivo; B (agua destilada estéril): control del diluyente; D: SLC o precipitado sin diluir; la numeración 1 a la 6 indican las diluciones seriadas realizadas.

Adicionalmente, se observó un tamaño promedio de las zonas de inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes* fue de $16,67 \pm 0,58$ mm para el SLC. Este resultado no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con los tamaños de los halos formados a partir de los precipitados obtenidos después de la purificación parcial (Tabla 2-2). Algunos autores han encontrado zonas de inhibición de magnitudes similares a las obtenidas en el presente estudio, con tamaños que varían entre 11 y 19,5 mm frente a cepas de *Listeria* spp. utilizando bacteriocinas producidas por cepas bacteriocinogénicas como *P. pentosaceus* ATCC 43200 (De Souza *et al.*, 2018). En otros casos han encontrado un tamaño mayor a 20 mm frente *L. monocytogenes* a partir de otras bacteriocinas producidas por *Lb. plantarum* (Lv *et al.*, 2018).

Tabla 2-2 Diámetros de inhibición (mm) del extracto crudo y precipitados obtenidos a partir del tratamiento con sulfato de amonio. Se muestran los resultados obtenidos para cada una de las 8 diluciones realizadas del SLC y/o precipitado obtenido.

Dilución	Diámetros de inhibición (mm)							
	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Control	16,67±0,58	15,33±0,58	13,33±0,58	11,67±0,58	9,67±0,58	7,67±0,58	3,00±0,00	0,00±0,00
SLC	16,67±0,58	15,33±0,58	13,67±0,58	12,67±0,58	11,33±0,58	10,00±0,00	8,00±0,00	6,33±0,58
60P	14,33±0,58	13,00±0,00	11,00±0,00	9,67±0,58	7,33±0,58	3,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
70P	15,33±0,58	13,67±0,58	11,33±0,58	10,00±0,00	8,33±0,58	5,33±0,58	3,33±0,58	0,00±0,00

80P	15,33±0,58	13,00±0,00	11,67±0,58	10,33±0,58	7,67±0,58	6,67±0,58	3,67±1,15	0,00±0,00
Quitosano	6,67±0,58	4,00±0,00	3,00±0,00	1,33±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Al obtener los valores de actividad antimicrobiana en unidades arbitrarias se observó que a diferencia del tamaño de las zonas de inhibición, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las unidades de medida de la actividad antimicrobiana, donde el valor mayor encontrado fue del SLC crudo con 8.533,33 UA/mL, seguido de los precipitados obtenidos a partir de saturaciones del 70% y 80% con una actividad de 4.266,67 UA/mL (Tabla 2-4). Esto puede ser debido principalmente a que en el SLC no se encuentran únicamente bacteriocinas, sino que además puede tener otros compuestos con actividad antagónica frente a bacterias. Dentro de estas sustancias se encuentra el ácido láctico u otros ácidos orgánicos; además de la presencia de peróxido de hidrógeno y diacetilo (Shah y Rajiv, 2002).

Estudios con bacteriocinas de cepas de *Pediococcus spp.* han mostrado actividades antimicrobianas variables. Un estudio realizado con bacteriocinas producidas por *P. acidilactici* HW01 presentaron una actividad de 640 UA/mL (Ahn, Kim, & Kim, 2017). El SLC producido por *P. pentosaceus* LB44 mostró una actividad de 3.200 UA/mL cuando fue precipitado con sulfato de amonio con diferentes saturaciones entre 25% y 50%; sin embargo, los autores de este estudio observaron que la actividad incrementó a 6.400 UA/mL cuando utilizaron saturaciones entre 60% y 80% de sulfato de amonio (Kaur y Tiwari, 2018). Esto demuestra que las condiciones de purificación deben ser estudiadas y estandarizadas de acuerdo a la cepa de trabajo para la obtención de la mejor actividad del agente antimicrobiano.

2.3.3 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

La cuantificación de proteína total, del SLC y precipitados tratados con sulfato de amonio, se realizaron por método de Bradford, utilizando como estándar 8 concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) para realizar la curva de calibración (Figura 2-3). La lectura se realizó utilizando una longitud de onda de 595nm. Los análisis estadísticos arrojaron un R^2 igual a 0,9895 con una ecuación donde la concentración fue igual a

$0,005162 + (1,290981 * \text{Absorbancia})$. Los análisis para la determinación de la curva de calibración y estudio de las muestras se realizaron por triplicado.

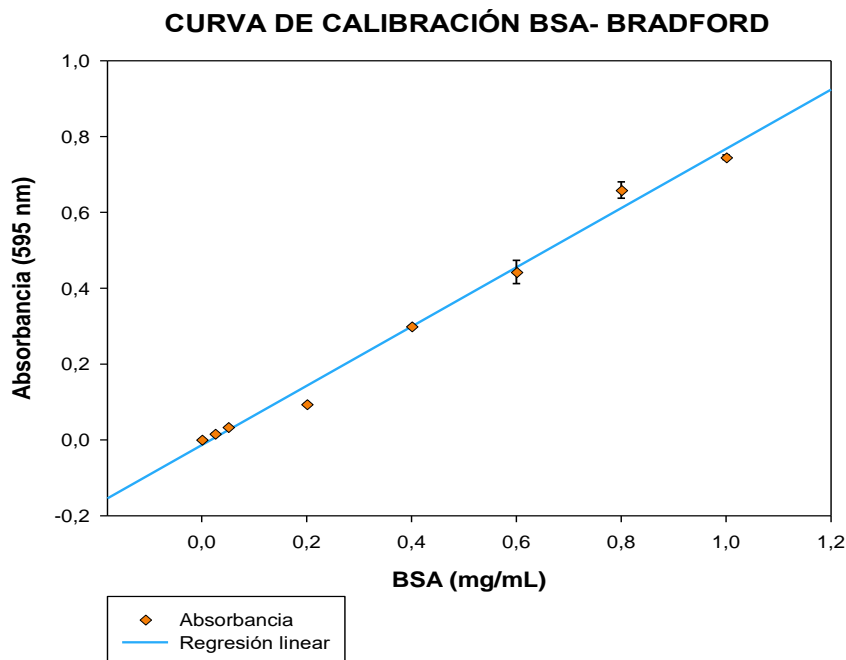


Figura 2-3 Curva de calibración para la determinación de proteínas totales, utilizando como patrón Albumina de Suero Bovino (BSA).

A partir de las absorbancias obtenidas y utilizando la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración se calculó la concentración de proteína total del SLC en un valor de $182,89 \pm 1,49 \mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el SLC y los precipitados. Esta concentración disminuyó a un poco menos de la mitad cuando se realizó la precipitación con sulfato de amonio con porcentajes de saturación de 60%, 70% y 80%, los cuales tenían una concentración de $64,12 \mu\text{g/mL}$, $65,84 \mu\text{g/mL}$ y $73,58 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 2-3).

Tabla 2-3 Determinación de la concentración de proteína total por el método de Bradford

Paso de purificación	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
SLC	182,89 ^a
Saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60%	64,12 ^b
Saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%	65,84 ^b
Saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%	73,58 ^b

Las letras minúsculas en la columna de concentración de proteína representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Resultados similares han sido encontrados en otros estudios, donde se ha reportado la reducción de la concentración de proteínas totales después de aplicar diferentes técnicas de precipitación. Dentro de dichos estudios se ha visto que el SLC de *P. pentosaceus* VJ13B, con una concentración de 82,84 ± 9,42 mg/mL en el extracto crudo, disminuye a 67,4 ± 4,87 mg/mL cuando es precipitado con acetona (Vidhyasagar y Jeevaratnam, 2013). Otras cepas como *P. pentosaceus* NCDC 273 han demostrado actividades de 2,17 mg/mL en SLC y en sus precipitados obtenidos, después de utilizar una saturación del 80% de (NH₄)₂SO₄, fue de 1,05 mg/mL. Estos resultados concuerdan con lo observado en este estudio, donde la concentración puede llegar a disminuir hasta la mitad. A pesar de observar que la concentración de proteínas totales presente en el SLC de este estudio es baja, comparada con las concentraciones obtenidas por los autores previamente mencionados, se puede decir que se obtuvo una buena actividad antimicrobiana como se demostró en el numeral 2.3.2.

2.3.4 Análisis purificación parcial de la bacteriocina

A partir de los resultados obtenidos se completó la Tabla 2-4 de purificación de las bacteriocinas, donde se muestra la evaluación del rendimiento (%), la cual se basa en la recuperación de la actividad antimicrobiana después de cada paso de purificación. Se observó que el porcentaje de rendimiento alcanzado utilizando un porcentaje de saturación de 70% y 80% de (NH₄)₂SO₄ fue de 26,67%; este valor fue mayor comparado con el valor obtenido cuando el SLC se trató con un porcentaje de saturación menor. Chen *et al.*, (2014) y Vijay *et al.* (2012) obtuvieron un porcentaje de rendimiento del 64%, por lo que consideran que el sulfato de amonio es de gran utilidad para la concentración inicial de bacteriocinas a partir del SLC, considerando además pasos adicionales para la purificación. Zhang *et al.* (2018) obtuvo un 48% de rendimiento al utilizar un porcentaje de saturación del 80%, y además realizó otros pasos de purificación como cromatografía de intercambio iónico para aumentar la pureza de una bacteriocina producida por *L. plantarum* J23.

Tabla 2-4 Purificación parcial de la bacteriocina producida por *P. pentosaceus* 147.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad antimicrobiana (UA/mL)	Actividad Total (10 ⁴ UA)	Actividad específica (UA/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)

SLC	15	8.533,33	12,8	46.659,10	1,00	100
Saturación de (NH ₄) ₂ SO ₄ al 60%	8	2.133,33	1,71	33.272,76	0,71	13,33
Saturación de (NH ₄) ₂ SO ₄ al 70%	8	4.266,67	3,41	62.360,13	1,34	26,67
Saturación de (NH ₄) ₂ SO ₄ al 80%	8	4.266,67	3,41	57.983,85	1,24	26,67

Por otro lado, se observó que cuando se realizó el proceso de purificación parcial la actividad específica aumentó de 46.659,10 UA/mg hasta 62.36013 UA/mg cuando se utilizó (NH₄)₂SO₄ con un porcentaje de saturación del 70%. Esto se correlacionó con las veces de purificación, es decir que entre más puras se encontraban las bacteriocinas, mayor era la actividad específica. Esta metodología permitió demostrar, que la purificación más alta de la bacteriocina alcanzada fue de 1,34 veces. En este sentido, Vijay *et al.* (2012) purificó una bacteriocina, producida por *P. pentosaceus* NCDC 273, 1,3 veces con una actividad específica de 7.800 UA/mg; además encontró que la fracción obtenida después de realizar cromatografía de intercambio iónico fue purificada 340 veces y presentó una actividad específica de 3.740.000 UA/mg.

Este análisis permitió demostrar que la purificación parcial resultó en una pérdida importante de la concentración de proteínas totales, sin embargo, se observó que la actividad específica incrementó, indicando mayor pureza en los precipitados obtenidos. El óptimo de recuperación se obtuvo usando un porcentaje de saturación del 70% de (NH₄)₂SO₄. Sin embargo, el porcentaje de rendimiento es menos del 30%, con un valor de purificación de 1,34 veces, con respecto al SLC. Esta aproximación muestra dos puntos desfavorables: el primero el bajo rendimiento al momento de obtener el precipitado y el segundo la disminución de la actividad antimicrobiana. Este mismo escenario se ha presentado en otras investigaciones realizadas. Lv *et al.*, (2018) reportaron disminución en el rendimiento en la concentración de proteínas utilizando la precipitación por sulfato de amonio, por tanto, utilizaron nuevas metodologías, como la extracción por acetato de etilo, que les permitió obtener hasta un 40% de rendimiento de la bacteriocina producida por *Lb. plantarum* DY4-2.

Por lo observado en estos resultados, se propone el uso de metodologías complementarias, que han sido utilizadas por otros autores (Chen *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2014; Vijay *et al.*, 2012) y que permiten una mayor purificación de las bacteriocinas; dentro de estas se encuentra cromatografía de intercambio iónico, extracción en fase sólida, o

cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Estudios han obtenido una recuperación de hasta el 80% del péptido antimicrobiano, usando saturaciones del 80%, como en el caso de la Pediocina ST18; sin embargo, en dicho estudio se requirieron pasos subsecuentes, como el uso de una columna Sep-Pack 18 y HPLC para purificar las bacteriocinas (Todorov y Dicks, 2005). Se ha observado que los estudios con varios pasos de purificación tienen como resultado bacteriocinas altamente puras, pero con un porcentaje de recuperación bajo. Un ejemplo de lo anterior es el SLC con lactocina MM₄ el cual fue sometido a diferentes pasos de purificación como extracción por acetato de etilo, paso por una columna de intercambio iónico y por último HPLC, obteniendo una bacteriocina 89,9 veces purificada pero con un rendimiento de hasta 0,51% (Hu *et al.*, 2017).

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente y teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 2-4, que demostraron que el porcentaje de rendimiento durante la purificación parcial de la bacteriocina fue menor al 30%, se decidió utilizar el SLC de forma directa para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria.

2.3.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los halos de inhibición para la evaluación de la CMI se pueden observar en la Figura 2-4. Se encontró que la CMI del SLC de *P. pentosaceus* 147 se ubicó en la dilución 1/32 (número 5), con una concentración de 5,72 µg/mL.

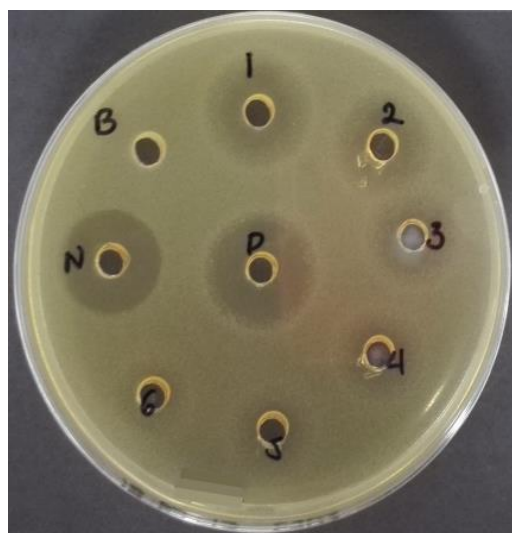


Figura 2-4 CMI del SLC de *P. pentosaceus* 147. Los números 1 al 6 representan las diluciones seriadas realizadas del SLC, N (nisina): control

positivo, y B (agua destilada estéril): control del diluyente. D: SLC sin ninguna dilución.

Este valor concuerda con los resultados obtenidos utilizando el método de macrodilución en caldo. Estos resultados se pueden observar en la Figura 2-5, donde el tubo número 1 representa la dilución 1/2, es decir una concentración de 91,45 µg/mL; a partir de este se realizaron 10 diluciones seriadas hasta llegar a la dilución 1/1024 con una concentración de 0,178 µg/mL. El tubo número cinco (1/32), correspondiente a la concentración 5,72 µg/mL, representó la dilución en la cual no hubo crecimiento de *L. monocytogenes*.

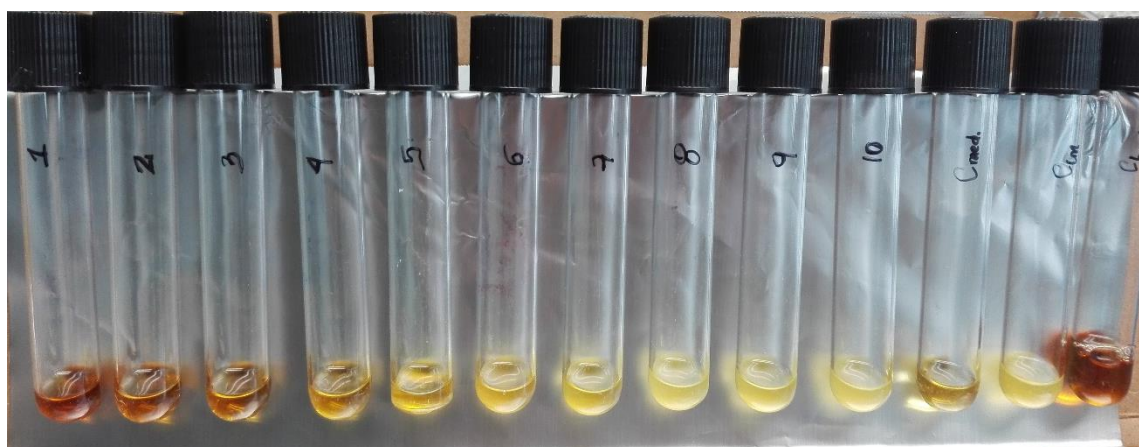


Figura 2-5 Concentración mínima inhibitoria obtenida por macrodilución en caldo del SLC de *P. pentosaceus* 147. Al final se encuentra el tubo de control del medio, control de crecimiento y control de esterilidad del SLC.

Los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con otros estudios realizados con bacteriocinas. Yi *et al.* (2016) encontraron resultados similares en la CMI de Lactocina XN8-A con un valor de 6,85 µg/mL. Sin embargo, otros análisis han hallado valores mayores de la CMI, obtenidos a partir de otro tipo de bacteriocinas. Por ejemplo Al-Seraih *et al.* (2017) encontró que el valor de la CMI de la enterocina B3A-B3B frente a las cepas *L. monocytogenes* 162 y *L. monocytogenes* 162R fue de 64 µg/mL; por otro lado, Naghmouchi *et al.* (2011) obtuvieron una CMI de 10–20 µg/mL para pediocina PA-1 y 7,5 µg/mL para polimixina E. Comparando dichos resultados con los obtenidos en este estudio, se puede observar que el valor de la CMI hallada por dichos autores es mayor; sin embargo es posible concluir que a pesar de que el valor de la CMI de este estudio (5,72 µg/mL) fue menor; este resultado presenta una gran actividad inhibitoria, como se observa en los resultados de actividad antimicrobiana. Esto demuestra el uso potencial de las

bacteriocinas obtenidas de *P. pentosaceus* 147 en la industria alimentaria; ya que, a concentraciones bajas, pueden mostrar un buen efecto antimicrobiano.

2.4 Conclusiones

Durante la purificación parcial de las bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147, se observó que a pesar de que la actividad específica aumenta durante la purificación parcial con sulfato de amonio, el porcentaje de rendimiento fue bajo. Por lo tanto, se escogió el SLC como la mejor fracción a utilizar para los ensayos posteriores.

Se comprobó la actividad antimicrobiana de las cepas de *P. pentosaceus* 147 frente a la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644, la cual fue de 8.533,33 UA/mL. La concentración de proteínas totales del SLC fue de 182,89 µg/mL y la CMI en la cual se encontró actividad frente a *L. monocytogenes* fue de 5,72 µg/mL. Estos datos son de importancia para el estudio y aplicación de las bacteriocinas a nivel *in situ*.

2.5 Referencias

- Ahn, H., Kim, J., & Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control*, 80, 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022>
- Al-Seraih, A., Belguesmia, Y., Baah, J., Szunerits, S., Boukherroub, R., & Drider, D. (2017). Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(2), 205–219. <http://doi.org/10.1007/s10482-016-0791-5>
- Apolônio, A. C. M., Carvalho, M. A. R., Bemquerer, M. P., Santoro, M. M., Pinto, S. Q., Oliveira, J. S., ... Farias, L. M. (2007). Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *Journal of Applied Microbiology*, 0(0), 071008041820002–??? <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03565.x>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2017). Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with anti-listerial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. *Journal of dairy science*, 1–10. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>

Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2018). Potential Control of *Listeria monocytogenes* by Bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* ST57ACC and *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC Strains Isolated From Artisanal Cheese.

Chen, C., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Li, W., & Dong, M. (2014). A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501 associated with Chinese Dong fermented meat (Nanx Wudl). *Food Control*, 42, 116–124. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.031>

De Souza, P., Converti, A., Gierus, M., & De Souza, R. (2018). Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*: from shake flasks to bioreactor. *Molecular Biology Reports*, 0(0), 0. <http://doi.org/10.1007/s11033-018-4495-y>

Goulhen, F., Meghrou, J., & Lacroix, C. (1998). Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 387–397. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00526.x>

Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. *Annals of Microbiology*, 68(6), 383–398. <http://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>

Hu, Y., Liu, X., Shan, C., Xia, X., Wang, Y., Dong, M., & Zhou, J. (2017). Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, 77, 290–297. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.007>

Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., & Haertlé, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*, 78, 187–195. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.060>

Kana, J. R., & Meimandipour, A. (2017). Antimicrobial Activity of Chitosan Film Forming Solution Enriched with Essential Oils; an in Vitro Assay. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 111–119. <http://doi.org/10.15171/ijb.1360>

Katharopoulos, E., Touloupi, K., & Touraki, M. (2016). Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 123–131. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.003>

Kaur, R., & Tiwari, S. K. (2018). Membrane-acting bacteriocin purified from a soil isolate *Pediococcus pentosaceus* LB44 shows broad host-range. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 810–816. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.062>

Kumar, K. N., Devadas, S. M., Murugan, S., Krishnan, S. G., & Thayumanavan, T. (2018). Production and Characterization of Bacteriocin by Lactic Acid Bacterium- *Pediococcus pentosaceus* NKSM1 Isolated from Fermented ' Appam ' Batter. *Journal of pure and applied microbiology*, 12(3), 1315–1330.

Kumari, A., Akkoç, N., & Akçelik, M. (2012). Purification and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL171. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1647–1655. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0971-4>

Lv, X., Ma, H., Sun, M., Lin, Y., Bai, F., Li, J., & Zhang, B. (2018). A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control*, 89, 22–31. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.002>

Marques, J. de L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruxen, C. E. dos S., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., ... Silva, W. P. da. (2017). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria*

monocytogenes in cheese. Food Microbiology, 63, 159–163.
<http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>

Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., & Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Research in Microbiology, 162(2), 99–107. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.014>

Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology, 79(1–2), 3–16.
[http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)

Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. P. S. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. Biotechnology Advances, 35(3), 361–374. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>

Sadishkumar, V., & Jeevaratnam, K. (2017). Purification and partial characterization of antilisterial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* KJBC11 from Idli batter fermented with Piper betle leaves, (February). <http://doi.org/10.1111/jfbc.12460>

Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 121(2), 123–138.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>

Shah, N., & Rajiv, D. (2002). Antimicrobial Lactic Substances Including Bacteriocins Produced by Acid Bacteria *Nagendra P. SHAH1* * of Life Sciences , of Technology , Melbourne City Mail Centre , Australia address : Dairy Science Dakota State Received for publication , This brief over. Bioscience Microflora, 21(4), 217–223.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1–29.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Process Biochemistry, 40(1), 365–370.
<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.011>

Vera, E., Salvucci, E., Sesma, F., & Nader-Macías, M. E. (2014). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.

Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. Biomed. Chromatogr., 27, 1497–1502. <http://doi.org/10.1002/bmc.29481497>

Vijay, B., Sood, S. K., Kumariya, R., & Garsa, A. K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. Microbiological Research, 167(9), 544–549. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.001>

Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B., & Lü, X. (2016). Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. Food Control, 67, 53–62. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.008>

Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., ... Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. Frontiers in Microbiology, 9(OCT), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02165>

Ahn, H., Kim, J., & Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Control, 80, 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022>

Al-Seraih, A., Belguesmia, Y., Baah, J., Szunerits, S., Boukherroub, R., & Drider, D. (2017). Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 110(2), 205–219. <http://doi.org/10.1007/s10482-016-0791-5>

Apolônio, A. C. M., Carvalho, M. A. R., Bemquerer, M. P., Santoro, M. M., Pinto, S. Q., Oliveira, J. S., ... Farias, L. M. (2007). Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. Journal of Applied Microbiology, 0(0), 071008041820002-??? <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03565.x>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72, 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2017). Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with anti-listerial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. Journal of dairy science, 1–10. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>

Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2018). Potential Control of *Listeria monocytogenes* by Bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* ST57ACC and *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC Strains Isolated From Artisanal Cheese.

Chen, C., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Li, W., & Dong, M. (2014). A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501 associated with Chinese Dong fermented meat (Nanx Wudl). Food Control, 42, 116–124. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.031>

De Souza, P., Converti, A., Gierus, M., & De Souza, R. (2018). Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*: from shake flasks to bioreactor. Molecular Biology Reports, 0(0), 0. <http://doi.org/10.1007/s11033-018-4495-y>

Goulhen, F., Meghrou, J., & Lacroix, C. (1998). Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. Journal of Applied Microbiology, 85(2), 387–397. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00526.x>

Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. Annals of Microbiology, 68(6), 383–398. <http://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>

Hu, Y., Liu, X., Shan, C., Xia, X., Wang, Y., Dong, M., & Zhou, J. (2017). Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, 77, 290–297. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.007>

Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., & Haertlé, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*, 78, 187–195. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.060>

Kana, J. R., & Meimandipour, A. (2017). Antimicrobial Activity of Chitosan Film Forming Solution Enriched with Essential Oils; an in Vitro Assay. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 111–119. <http://doi.org/10.15171/ijb.1360>

Katharopoulos, E., Touloupi, K., & Touraki, M. (2016). Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 123–131. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.003>

Kaur, R., & Tiwari, S. K. (2018). Membrane-acting bacteriocin purified from a soil isolate *Pediococcus pentosaceus* LB44 shows broad host-range. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 810–816. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.062>

Kumar, K. N., Devadas, S. M., Murugan, S., Krishnan, S. G., & Thayumanavan, T. (2018). Production and Characterization of Bacteriocin by Lactic Acid Bacterium- *Pediococcus pentosaceus* NKSM1 Isolated from Fermented ‘ Appam ’ Batter. *Journal of pure and applied microbiology*, 12(3), 1315–1330.

Kumari, A., Akkoç, N., & Akçelik, M. (2012). Purification and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LL171. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1647–1655. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0971-4>

Lv, X., Ma, H., Sun, M., Lin, Y., Bai, F., Li, J., & Zhang, B. (2018). A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control*, 89, 22–31. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.002>

Marques, J. de L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruxen, C. E. dos S., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., ... Silva, W. P. da. (2017). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Microbiology*, 63, 159–163. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>

Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., & Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162(2), 99–107. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.014>

Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1–2), 3–16. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)

Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. P. S. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361–374. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>

Sadishkumar, V., & Jeevaratnam, K. (2017). Purification and partial characterization of antilisterial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* KJBC11 from Idli batter fermented with Piper betle leaves, (February). <http://doi.org/10.1111/jfbc.12460>

Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 123–138. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>

Shah, N., & Rajiv, D. (2002). Antimicrobial Lactic Substances Including Bacteriocins Produced by Acid Bacteria *Nagendra P. SHAH1* * of Life Sciences , of Technology , Melbourne City Mail Centre , Australia address : Dairy Science Dakota State Received for publication , This brief over. *Bioscience Microflora*, 21(4), 217–223.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1–29.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal

beverage from Bulgaria. Process Biochemistry, 40(1), 365–370.
<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.011>

Vera, E., Salvucci, E., Sesma, F., & Nader-Macías, M. E. (2014). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.

Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. Biomed. Chromatogr., 27, 1497–1502. <http://doi.org/10.1002/bmc.29481497>

Vijay, B., Sood, S. K., Kumariya, R., & Garsa, A. K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. Microbiological Research, 167(9), 544–549.
<http://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.001>

Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B., & Lü, X. (2016). Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. Food Control, 67, 53–62. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.008>

Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., ... Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. Frontiers in Microbiology, 9(OCT), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02165>

3.Capítulo III. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de películas comestibles de quitosano incorporadas con bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147

Resumen

La caracterización y efecto antimicrobiano de recubrimientos comestibles de quitosano que contenían bacteriocinas producidas por *Pediococcus pentosaceus* 147 fue investigado. Las películas con la adición de sobrenadante libre de células (SLC) mostraron que la permeabilidad al vapor de agua (PVA) aumentó, comparado con la película control. Por el contrario, la fuerza tensil y porcentaje de elongación disminuyeron. No se observaron diferencias en la morfología a través de microscopia electrónica (SEM). Adicionalmente, la actividad de la película fue evaluada *in vitro* frente a *Listeria monocytogenes*, observando el incremento de la actividad antagonista cuando se incorporó el SLC.

3.1 Introducción

Las alteraciones microbiológicas y fisicoquímicas de productos alimenticios son responsables de enormes pérdidas en la industria alimentaria, por lo tanto, procesos físicos y químicos se han desarrollado para extender la vida útil de algunos productos y mantener la calidad de estos. Los recubrimientos comestibles, como barreras antimicrobianas, son alternativas para preservar los alimentos debido a que son considerados sistemas de empaque activo con alta efectividad para inhibir microorganismos de deterioro y/o patogénicos que contaminan los alimentos. Además de lo anterior, son capaces de controlar la humedad, oxígeno, aromas, transporte de solutos, entre otras características (Dutta *et al.*, 2009).

Los empaques comestibles son usualmente formados por sustancias como proteínas, polisacáridos, lípidos, resinas y/o combinaciones de estos (Dutta *et al.*, 2009). En este sentido, ha sido demostrado que el quitosano, un biopolímero obtenido a partir del exoesqueleto de crustáceos, o de la pared celular de algunos hongos u otros materiales biológicos, ha sido una sustancia con potencial aplicación y uso para la formación de películas comestibles. Otra característica, es que presenta actividad antimicrobiana propia, cuyo mecanismo de acción no es conocido exactamente; sin embargo, se ha planteado que los grupos amino cargados de forma positiva, interactúan con las cargas negativas de la membrana celular de los microorganismos y esto conduce a la salida de componentes intracelulares (Dutta *et al.*, 2009).

En general, se conoce que las películas comestibles de quitosano poseen buenas propiedades mecánicas, sin embargo, tiene alta permeabilidad al vapor de agua por lo que puede limitar su uso. Una de las ventajas es que la adición de lípidos neutros o ceras de ácidos grasos pueden mejorar este último aspecto (Elsabee y Abdou, 2013). Por otro lado, es importante conocer la composición y estructura de los recubrimientos comestibles, ya que estas características pueden afectar los mecanismos de transferencia de agua y por lo tanto las propiedades de barrera (Morillon *et al.*, 2010).

Tanto los recubrimientos como los alimentos están expuestos a diversos factores durante el procesamiento, transporte y almacenamiento. Esto hace indispensable el estudio sobre su comportamiento en función de algunos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. En el presente capítulo se describe la caracterización de películas comestibles de quitosano y el efecto de la incorporación del sobrenadante libre de células como vehículo de bacteriocinas producidas por *P. pentosaceus* 147.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Elaboración de recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles fueron preparados de acuerdo con la formulación propuesta por (Piedrahita-Marquéz, 2017; Piedrahita-Marquéz *et al.*, 2018), quien caracterizó previamente recubrimientos comestibles de quitosano. Para la preparación se

disolvieron 4g de quitosano en 200mL de una solución de ácido láctico al 1 % (v/v) bajo agitación continua a 40 °C durante 2h. La mezcla se filtró y se le adicionó 1 mL de glicerol como agente plastificante y 1 mL de Tween® 80 como agente tensoactivo a 67 °C. Posteriormente, de acuerdo con el tipo de preparación se adicionó la concentración adecuada de SLC, obtenida de acuerdo a la sección 2.2.2, y se homogenizó la mezcla utilizando ULTRA-TURRAX® IKA (T18, Ika-werke, Alemania) a 8000 rpm por 5 min. Las películas se prepararon poniendo 12 mL de la solución en cajas de Petri de 9 cm de diámetro y se dejaron secar en un horno al vacío con una temperatura de 45°C durante 24 h. Para el análisis se realizaron dos preparaciones: PC: película control de quitosano sin SLC (control) y PS: película de quitosano con SLC, utilizando la CMI previamente hallada en la sección 2.3.4 (5,72 µg/mL). El SLC se adicionó después de la aplicación de los agentes tensoactivo y plastificante. Las películas se almacenaron a 20°C a 50% de HR hasta su análisis.

3.2.2 Permeabilidad del vapor del agua

Inicialmente, el espesor de la película se midió con un micrómetro (Stanprof®) en diez posiciones aleatorias. Estos valores fueron utilizados para calcular la permeabilidad al vapor de agua (PVA) (Martins *et al.*, 2010). Las mediciones de permeabilidad al vapor del agua (PVA) se determinaron gravimétricamente de acuerdo con el método ASTM E96-92 (ASTM, 1992), usando copas con un diámetro de 2 cm. Las películas se pusieron sobre las copas que contenían agua destilada (100% HR; presión de vapor de 2337 Pa a 20°C). Este montaje se ubicó en un desecador a 20°C que contenía sílica gel. Los pesos se tomaron en intervalos de una hora hasta la hora 8. La PVA ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) de las películas se calculó realizando una regresión linear de los puntos de la pérdida de peso versus el tiempo (Fajardo *et al.*, 2010).

La tasa de transmisión de vapor de agua (PVAT) se obtuvo usando la Ecuación (3.1):

$$PVAT = \frac{\Delta G}{t \times A} \quad \text{Ecuación (3.1)}$$

Donde ΔG es el cambio de peso (g), t el tiempo durante el cual ocurre ΔG (h), A es el área de la copa (m^2), y $\Delta G / t$ es la pendiente de la gráfica lineal. Luego de ello, se aplicó la Ecuación (3.2) para hallar la PVA.

$$PVA = \frac{PVAT \times l}{\Delta p} \quad \text{Ecuación (3.2)}$$

Donde l (m) es el grosor de la película y Δp es la diferencia de presión de vapor entre ambas caras de la película (Pa). La media se obtuvo a partir de tres mediciones realizadas por muestra (Davidović *et al.*, 2018).

3.2.3 Contenido de humedad

El contenido de humedad y solubilidad en agua de las películas se realizó por el método gravimétrico de acuerdo con Torres-León *et al.* (2018). Muestras de las películas de 2x2 cm fueron pesadas (M_0) y colocadas en un horno a 105°C durante 24 h hasta llegar a peso constante, transcurrido este tiempo se pesaron nuevamente (M_1). El contenido de humedad se determinó como el porcentaje de la pérdida del peso inicial de la película durante el secado, reportado sobre base seca de acuerdo con la Ecuación (3.3).

$$\text{Contenido de humedad}(\%) = \frac{(M_0 - M_1)}{M_0} \times 100 \quad \text{Ecuación (3.3)}$$

3.2.4 Color

Para la determinación del color, se utilizó un colorímetro Hunterlab (ColorQuest XE, USA) calibrado con un estándar minolta blanco con los siguientes parámetros: $X= 80,10$, $Y= 84,98$ y $Z= 89,33$. Para ello fue usada la escala CIE $L^*a^*b^*$. La diferencia total de color (ΔE^*) y la intensidad de color (c^*), se calcularon de acuerdo con las ecuaciones Ecuación (3.4) y Ecuación (3.5). Las mediciones se realizaron por triplicado.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación (3.4)}$$

$$c^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación (3.5)}$$

3.2.5 Transmisión de luz y opacidad

Los valores de transmisión de luz de las películas se obtuvieron mediante el uso del espectrofotómetro de luz visible a 600 nm (Genesys 10S Uv-Vis). Películas cortadas en rectángulos (1 x 4 cm) se pusieron en celdas de cuarzo y se utilizó una celda vacía como blanco referencia. Los valores de opacidad se expresaron como la tasa de absorbancia a 600 nm (A_{600}) y el grosor de la película (Nouraddini *et al.*, 2018). La opacidad se obtuvo con la Ecuación (3.6) de acuerdo con Wang *et al.* (2018).

$$Opacidad = \frac{A_{600}}{X} \quad \text{Ecuación (3.6)}$$

Donde A_{600} es la absorbancia a 600 nm y X es el espesor de la película en (mm).

3.2.6 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron de acuerdo al método descrito por Mei *et al.* (2013) con algunas modificaciones. La prueba se llevó a cabo usando un texturómetro TA-TX plus®. Películas de 20x80 mm se montaron en las mordazas de tensión. La separación inicial de las mordazas fue de 60 mm con una velocidad transversal de 0,83 mm/s. La fuerza tensil se calculó con base en el área transversal original de la muestra usando la Ecuación (3.7), mientras que el porcentaje de elongación (%EL) se obtuvo usando la Ecuación (3.8).

$$Fuerza\ tensil\ (FT) = \frac{N}{A} \quad \text{Ecuación (3.7)}$$

$$Porcentaje\ de\ elongación\ (\%EL) = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100 \quad \text{Ecuación (3.8)}$$

Donde N, representa la fuerza en la carga máxima en la ruptura (N), A hace referencia al área transversal inicial de la película (m^2). L_0 es la longitud inicial de la muestra (mm) y L es la longitud final de la muestra (mm).

3.2.7 Determinación de la actividad antilisteria de recubrimientos comestibles con quitosano

Para determinar la actividad antilisteria de los recubrimientos de quitosano sin SLC (PC: Película control) y con SLC (PS: Película con SLC) se utilizó el método de difusión en agar de acuerdo a lo descrito por Ollé *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Inicialmente 100 µL de una suspensión 4 Log UFC/mL de *L. monocytogenes* fue inoculada en la superficie de agar BHI (1% de agar). Posteriormente, 10 µL de las soluciones de PC y PS fueron colocados en la superficie del agar. Como controles de actividad se utilizó SLC sin diluir y Nisina®. El montaje se realizó por triplicado y fue incubado a 37°C durante 24 h, para la posterior medición (mm) del halo de inhibición.

3.2.8 Evaluación de la morfología por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de las películas se realizó usando microscopía electrónica de barrido (SEM) en el laboratorio de microscopia electrónica de la Universidad Nacional de Colombia. Inicialmente, muestras de un tamaño de 1,0 mm x 5,0 mm fueron recubiertas con una capa metálica de oro-paladio con la ayuda de un metalizador Q150R ES (Quorum). Posteriormente fueron observados en microscopio electrónico de barrido TESCAN (Vega3, Republica checa) con un voltaje de aceleración 8 Kv.

3.2.9 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA), seguido de prueba Tukey para comparar diferencias significativas entre tratamientos. La herramienta estadística utilizada fue R-studio. Para los análisis se tuvo en cuenta un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Los valores fueron expresados como la media \pm desviación estándar.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Propiedades fisicoquímicas

Los resultados obtenidos de espesor y humedad son presentados en la Tabla 3-1. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las dos formulaciones estudiadas. Durante la evaluación del espesor de la película (μm), se observó que la incorporación de agente antimicrobiano aumentó el espesor. Esto puede ser debido a que la adición del SLC cambia la composición de la película a nivel estructural. Esto mismo fue reportado por Santiago-Silva *et al.* (2009) y Quintero-Salazar *et al.* (2005) quienes observaron el incremento del espesor cada vez que se aumentaban las concentraciones de Pediocina (ALTA® 2351) y bacteriocinas a partir de *P. parvulus* VKMX133 en películas comestibles de celulosa y/o películas de proteínas de suero, respectivamente.

Tabla 3-1 Propiedades fisicoquímicas de películas comestibles.

Película	Espesor (μm)	Humedad (%)	PVA ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}^{-1}$)
PC	$24,67 \pm 0,58^b$	$28,03 \pm 1,06^a$	$1,11 \times 10^{-9}$
PS	$34,00 \pm 1,00^a$	$25,90 \pm 0,37^b$	$1,55 \times 10^{-9}$

PC: película de quitosano, PS: película de quitosano con $5,72 \mu\text{g/mL}$ de bacteriocinas. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0,05$).

Con respecto a la humedad el valor más alto se obtuvo con la película control. Se observó que la adición de bacteriocina disminuyó los niveles de humedad a un valor de $25,90 \pm 0,37\%$. Resultados similares fueron expuestos por Wang *et al.* (2018), quienes encontraron que la adición de otro componente como celulosa nanobacteriana a películas de agar, hubo una disminución del contenido de humedad, argumentando que la interacción entre estos dos compuestos bloqueó el paso del agua y su unión a través de puentes de hidrogeno. Esto también ha sido reportado por Basch *et al.* (2013) en películas de almidón adicionadas con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). De acuerdo con Cozmuta *et al.* (2015) los altos niveles de humedad, favorecen la adhesión de películas comestibles a productos acuosos, mientras que una película con bajo nivel de humedad es más apropiado para cubrir alimentos grasos, como quesos procesados o carne de cerdo.

Por otro lado, la permeabilidad del vapor de agua (PVA) es una característica importante para la aplicación de recubrimientos comestibles como sistemas de empaque de alimentos.

Esto refleja la habilidad de la película para prevenir o reducir la transferencia de agua entre el alimento y el ambiente (Homez-Jara *et al.*, 2018). Como se muestra en la Tabla 3-1 y en la Figura 3-1 la PVA para PC y PS fueron $1,11 \times 10^{-9} \text{ g.m}^{-1}.\text{s.Pa}^{-1}$ y $1,55 \times 10^{-9} \text{ g.m}^{-1}.\text{s.Pa}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos películas, ya que al adicionar el agente antimicrobiano la permeabilidad del agua aumentó. Resultados similares a los obtenidos por Basch *et al.* (2013), quienes adicionaron nisina y sorbato de potasio a películas de almidón con HPMC, y hubo un incremento de la PVA. Este comportamiento puede ser atribuido a que la presencia de los péptidos antimicrobianos del SLC, generan cambios en las interacciones del quitosano e interrupción en la matriz del biopolímero. Se ha descrito, que en el extremo N-terminal de las pediocinas hay mayor presencia de las regiones conservadas hidrofílicas, esto probablemente resulta en la interacción con las moléculas de agua y permite una mayor permeabilidad (Pranoto *et al.*, 2005). Adicionalmente, haciendo una comparación de los resultados obtenidos en este estudio, con respecto a otro análisis; se observó que los valores de PVA son mayores a los obtenidos por Fajardo *et al.* (2010) quien reportó un valor de $8,60 \times 10^{-11}$ para la película control (1% de quitosano) y $8,9 \times 10^{-11}$ para películas de quitosano con la bacteriocina natamicina. Estos valores más altos pueden deberse a que en las películas realizadas en este estudio presentan mayor concentración de quitosano (2%) y su alto valor de permeación, se atribuye a su naturaleza hidrofílica que le permite interactuar en mayor medida con moléculas de agua.

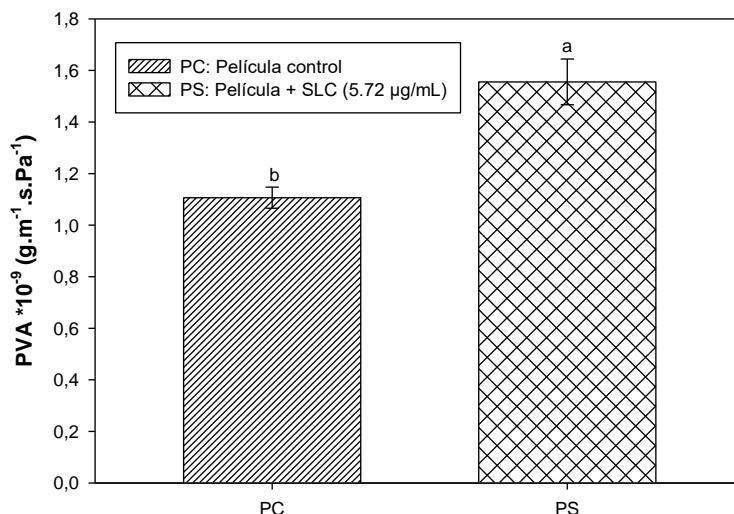


Figura 3-1 Permeabilidad de vapor de agua de las películas. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas (Prueba de Tukey, $p=0,00135$).

Por otro lado, Qin *et al.* (2015) hallaron valores de PVA de $2,18 \pm 0,02 \times 10^{-9}$ g·m/m²·s·Pa en películas de quitosano, los cuales lograron disminuir hasta $1,47 \pm 0,15 \times 10^{-9}$ g·m/m²·s·Pa cuando se adicionaron antioxidantes naturales obtenidos de la fruta granada. Estos últimos resultados son similares a los encontrados en este ensayo, los cuales fueron calificados como aceptables.

3.3.2 Color

En la Tabla 3-2 son presentados los resultados de la evaluación de color de las películas comestibles donde se evaluaron L^* (luminosidad), a^* (rojez/verdor) y b^* (amarillez/azulado). En este ensayo se determinó que las películas PC y PS fueron amarillas con ligeras tonalidades verdosas, con una saturación mayor para PS; esta apariencia fue similar a la obtenida por Aguirre-Loredo y Rodríguez-Hernández (2014), la cual incrementó cuando adicionaron a películas de quitosano, ácido oleico. Específicamente, los resultados obtenidos muestran que existe una diferencia de color (ΔE) entre las dos formulaciones de películas, la cual aumentó cuando se adicionó el SLC. En cuanto a la luminosidad (L^*) se observó una disminución cuando se adicionó el agente antimicrobiano. Con respecto al parámetro b^* se observó que tonalidades más amarillas fueron obtenidas en las películas que contenían SLC; adicionalmente, la saturación del

color (c^*) incrementó en estas películas, por otra parte, el parámetro a^* disminuyó. Estos cambios en la coloración, en especial el aumento de los parámetros b^* y c^* puede ser debido a que para la obtención del SLC de *P. pentosaceus* 147, se requieren medios específicos que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento y producción de metabolitos de la bacteria. El medio utilizado fue MRS, que por su composición tiene una pigmentación café-amarilla que puede influenciar el color de las películas realizadas. Por este motivo se puede suponer que si se realizaran diferentes procesos de purificación podría disminuir los pigmentos provenientes del medio de producción además de obtener un compuesto más puro.

Tabla 3-2 Evaluación de color en películas comestibles de quitosano incorporando sobrenadante libre de células de *P. pentosaceus* 147.

Película	Color					Opacidad (Abs600/mm)
	L^*	a^*	b^*	ΔE	c^*	
PC	90,65 \pm 0,26 ^a	-1,56 \pm 0,03 ^b	11,30 \pm 0,17 ^b	0,00 \pm 0,00	11,41 \pm 0,17 ^b	2,97 \pm 0,21 ^a
PS	86,11 \pm 0,57 ^b	-0,83 \pm 0,08 ^a	17,68 \pm 0,13 ^a	7,89 \pm 0,34	17,70 \pm 0,13 ^a	2,92 \pm 0,03 ^a

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0,05$).

En general, el color de las películas puede variar dependiendo de la composición y aditivos que se incorporan en la misma, por ejemplo Shapi y Othman (2016), observaron que en películas de almidón de tapioca los valores de a^* fueron de igual forma negativos (-1,03) con algunas tonalidades verdes, mientras que los valores de b^* aumentaban cuando incrementaba la concentración de quitosano, presentando tonalidades amarillas (3,86). En cuanto a la opacidad se puede observar que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) cuando se adicionó el SLC. A diferencia de otros estudios, como el realizado por Fajardo *et al.* (2010) que observó que la opacidad aumentó al adicionar natamicina a las películas de quitosano. Se puede concluir que la adición de otros componentes en las películas, tal como antioxidantes o sustancias como celulosa nanobacteriana (Qin *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018) pueden afectar directamente la transparencia de las películas haciendo que esta disminuya; sin embargo estos resultados son aceptables comparados con películas que pueden tener un impacto mayor a nivel visual. Por ejemplo, películas realizadas a partir de sustancias derivadas de mango, pueden llegar a tener una tonalidad amarilla con un valor b^* de hasta 53,13 y tonalidades rojizas donde el parámetro a^* puede ser de hasta 10,39 resultados reportados por Torres-León *et al.*, (2018).

3.3.3 Propiedades mecánicas

La evaluación de la fuerza tensil y porcentaje de elongación fueron contempladas en el análisis fisicoquímico de los recubrimientos comestibles, como se observa en la Figura 3-2. Una disminución significativa ($p < 0,05$) de la fuerza tensil se observó cuando se adicionó el SLC a la formulación de quitosano, la cual se redujo de $19,86 \pm 0,50$ MPa a $14,22 \pm 0,67$ MPa. Esto puede ser debido al cambio en las uniones del quitosano provocado por la incorporación de bacteriocinas que hace que haya una menor resistencia a la ruptura. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Pranoto *et al.* (2005) en donde la incorporación de nisina a películas de quitosano hizo que disminuyera la FT de $37,03 \pm 1,29$ a $23,70 \pm 6,29$ MPa. Por el contrario algunos estudios que han incorporado pediocina en películas de celulosa, han observado que hay un incremento de la fuerza máxima requerida para la ruptura, siempre y cuando esta cantidad no exceda el 50% de la composición (Santiago-Silva *et al.*, 2009). Otros resultados han mostrado una FT de películas de quitosano de aproximadamente 25 MPa, resultados cercanos a los obtenidos en este estudio (Kaya *et al.* 2018).

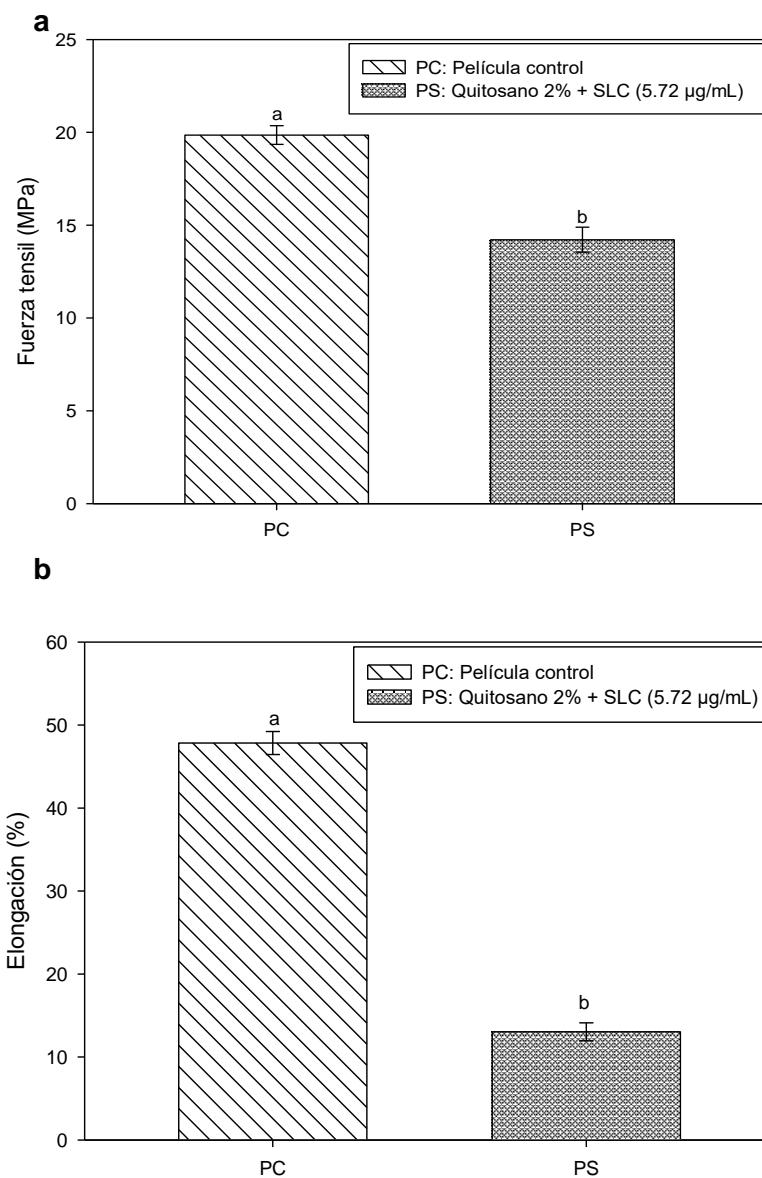


Figura 3-2 Fuerza tensil y porcentaje de elongación. **a** fuerza tensil (MPa) y **b** porcentaje de elongación de las películas preparadas: PC, control y PS quitosano + la CMI de la bacteriocina. Las diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

Con respecto al porcentaje de elongación se observó que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en las películas, mostrando que se disminuyó la elasticidad cuando se adicionó SLC. Esto demuestra que el aumento de la concentración de los agentes antimicrobianos

puede disminuir la flexibilidad de la película. Thakhiew *et al.* (2013) afirman que la adición de agentes antimicrobianos a películas comestibles afecta no solo propiedades antimicrobianas sino también las propiedades físicas, de barrera y mecánicas. Resultados similares para el porcentaje de elongación fueron obtenidos por estos autores, cuya película de quitosano sin adición de agentes antimicrobianos como extractos de galangal obtuvieron un valor de $32,5 \pm 3,6$, este valor disminuyó a $20,5 \pm 2,7$ con la adición del extracto al 1,5%. Igualmente Basch *et al.* (2013) encontraron que el porcentaje de elongación disminuyó hasta un 89% con respecto a las películas de almidón de tapioca, cuando se les adicionó nisina.

Otros resultados, similares a este estudio, fueron encontrados por Siripatrawan y Harte (2010) cuyos valores de FT y porcentaje de elongación, en películas de quitosano con extracto de té verde, fueron de 23,66 MPa y 54,62 %, respectivamente. A pesar de la variación de los resultados obtenidos en este análisis de las películas con SLC con respecto a la película control, se observa que las propiedades mecánicas de películas realizadas a base de quitosano son mejores, comparado con películas a base de otros materiales. Por ejemplo, películas de almidón han mostrado una FT de 7,3 MPa (Ali *et al.*, 2017), películas preparadas con carragenina semi-refinada con polisacáridos obtenidos a partir de algas marinas presentaron un porcentaje de elongación de 9,24 % (Ganesan *et al.*, 2018) o películas preparadas con pectina han mostrado FT de 7,12 MPa y porcentajes de elongación de 20%.

3.3.4 Determinación de la actividad antilisteria de recubrimientos comestibles con quitosano

En este estudio se decidió evaluar la actividad antilisteria del recubrimiento comestible de quitosano al 2%, teniendo en cuenta que este polímero ha mostrado actividad antimicrobiana contra microorganismos de importancia en la industria de alimentos (Anacarso *et al.*, 2011). Con respecto al recubrimiento de quitosano, se pudo evidenciar la actividad antimicrobiana que este biopolímero presenta frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644. Como se observa en la Figura 3-3 el recubrimiento de quitosano (Q) a una concentración del 2% (p/v) logró desarrollar un halo de inhibición de $14,10 \pm 1,06$ mm, otros autores han encontrado zonas de inhibición de aproximadamente 12 mm (Anacarso *et al.*, 2011). Adicionalmente, el análisis del efecto antimicrobiano del recubrimiento de quitosano

combinado con el SLC generó halos de inhibición con un diámetro mayor de $16,11 \pm 0,81$ mm. Este resultado demostró el efecto sinérgico del SLC junto con el quitosano.

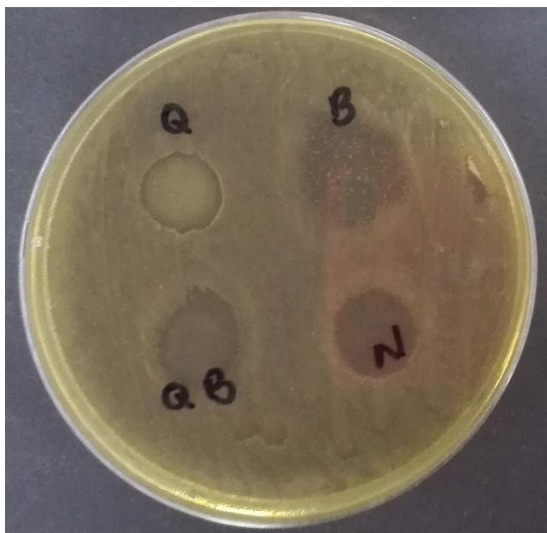


Figura 3-3 Actividad antimicrobiana de recubrimientos comestibles de quitosano. Q: quitosano al 2% (p/v); QB: Quitosano al 2% y SLC (5,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B: SLC; N (nisina): control

Algunos autores han estudiado el efecto antimicrobiano del quitosano combinado con bacteriocinas y han encontrado un aumento de la actividad antimicrobiana. Por ejemplo Anacarso *et al.* (2011), encontraron que una solución de quitosano al 2% actuó de forma sinérgica cuando se mezcló con el SLC de una cepa de *E. casseliflavus* IM 416K1, generando un halo de inhibición de 24 mm, comparado con el quitosano sin bacteriocina que tuvo 12 mm de diámetro. Con estos hallazgos, este trabajo evidenció la actividad antimicrobiana tanto del SLC de *P. pentosaceus* 147 como del quitosano. Así mismo se pudo confirmar que su combinación puede potenciar la actividad inhibitoria, considerando que podrían ser relevantes para la seguridad y control microbiológico de productos alimenticios.

Por otro lado, como se evidencia en la Figura 3-4, el sitio donde es aplicado el quitosano tiene un aspecto opaco; sin embargo, en este halo no se observa crecimiento de *L. monocytogenes*. Para confirmar que la opacidad no fue originada por contaminación bacteriana, se decidió cortar parte el área del medio que presentaba el halo de inhibición y se adicionó a caldo BHI. Después de 24 h de incubación a 37°C no se observó

crecimiento bacteriano. Adicionalmente se hizo una prueba adicionando unas gotas de solución de quitosano al 2% a caldo BHI, esto generó opacidad inmediata.



Figura 3-4 Prueba para comprobar el no crecimiento microbiano en halos de inhibición. a. crecimiento en halo de inhibición con quitosano al 2%. b. Turbidez generada cuando se adiciona una gota de quitosano en caldo BHI.

3.3.5 Evaluación de la morfología por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las características de la morfología de la superficie de las películas de quitosano (PC) y películas de quitosano con SLC (PS) fueron determinadas utilizando un aumento de 1000x, como se muestra en la Figura 3-5. La morfología superficial de PC se observó una con una dispersión homogénea, compacta sin presencia de poros, con algunas ondulaciones suaves homogéneas; características similares a las reportadas por otros autores (Kaya *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2015; Rubentheren *et al.*, 2015). Estas características fueron muy similares a la superficie de la película con SLC. Por el contrario otros autores han encontrado superficies completamente heterogéneas, porosas y con presencia de fisuras con la incorporación de bacteriocinas como nisina, péptido P34 y natamicina (Cé *et al.* 2012).

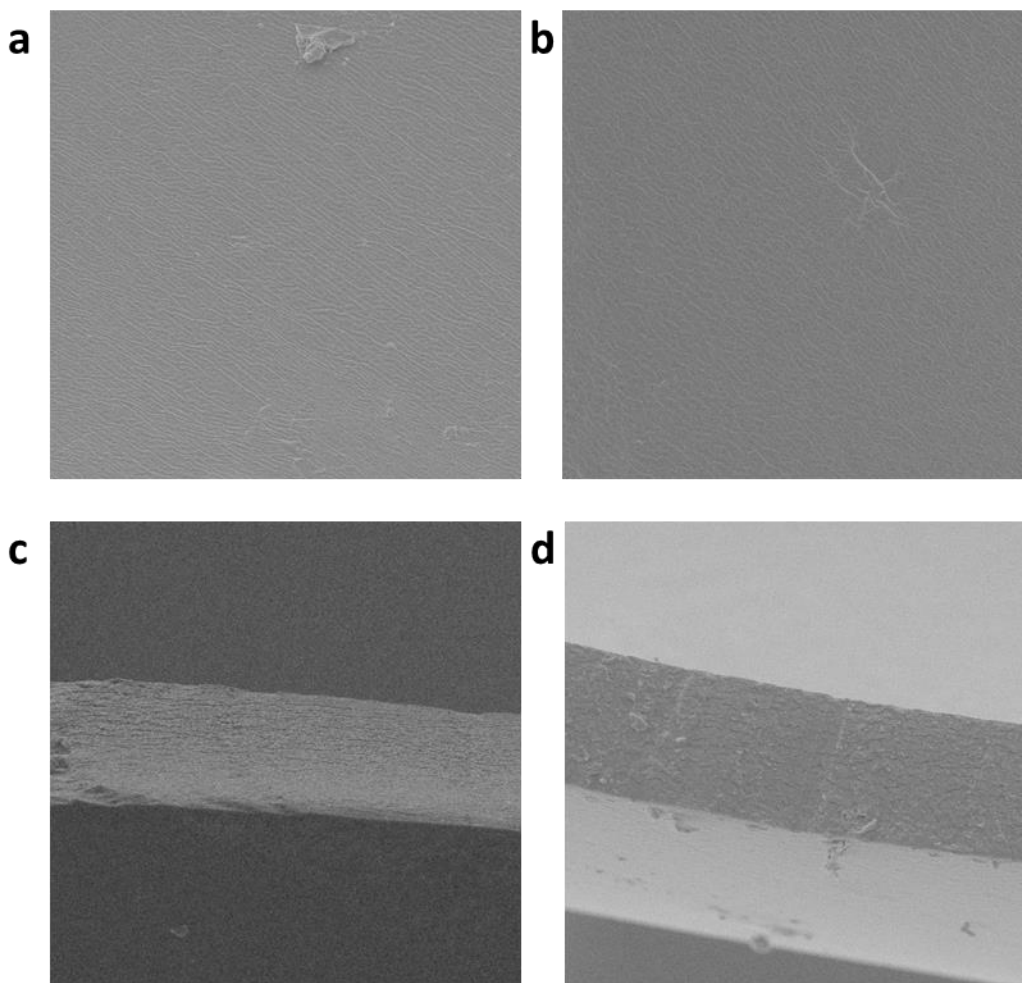


Figura 3-5 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de películas comestibles de quitosano con y sin SLC. La morfología de la superficie de **a.** PC y **b.** PS (1000x), y cortes transversales de **c.** PC y **d.** PS (1500x).

Los cortes transversales de las películas fueron analizados utilizando un aumento de 1500x. Para las dos películas se observan morfologías similares con estructuras compactas y uniformes, que muestran que el SLC fue incorporado a la matriz de quitosano, y que posiblemente existen uniones electrostáticas estables entre los componentes del SLC y el quitosano. Además, no se observó presencia de espacios o capas separadas en ninguna de las películas; estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Ibarguren *et al.* (2010) quienes no encontraron diferencias significativas entre las películas de gluten de trigo y gelatina que contenían o no enterocina CRL1385. Estas observaciones

son satisfactorias, comparadas con estudios de películas basadas en asilados de proteínas de suero solubles en agua, con incorporación de agentes antimicrobianos producidos por *P. parvulus* VKMX133, observando películas no estructuradas, que se asemejan a una red abierta con espacios (Quintero-Salazar *et al.*, 2005). Por otro lado, en la SEM de las dos películas bajo las mismas condiciones y aumento, se observaron diferencias en el grosor del corte transversal entre PC y PS; PS se observó más grueso que PC; esto concuerda con los resultados obtenidos durante la medición del espesor de las dos películas.

Las observaciones realizadas permiten concluir que los recubrimientos comestibles de quitosano con el SLC obtenido a partir de *P. pentosaceus* 147 pueden ser una excelente opción para su uso sobre alimentos, que posiblemente permitiría mantener la calidad del producto, es decir puede ser una alternativa atractiva como método de preservación para alimentos.

3.4 Conclusiones

Las películas comestibles elaboradas con quitosano y SLC presentaron un aumento del espesor y la permeabilidad al vapor de agua, lo cual puede deberse a la presencia regiones hidrofílicas del extremo N-terminal de las bacteriocinas de las bacteriocinas producidas por el género *Pediococcus* spp., por lo que hay una interacción con el agua y un aumento de la permeabilidad. La adición de SLC, pudo haber cambiado la interacción de las moléculas de quitosano disminuyendo la fuerza tensil y el porcentaje de elongación, a pesar de ello la morfología observada a través de SEM fue homogénea, lo que demuestra que, a pesar de los cambios, la red polimérica es estable.

Por otro lado, se comprobó la actividad antimicrobiana del quitosano, además de un posible efecto sinérgico cuando se adiciona agentes antimicrobianos como el SLC a partir de *P. pentosaceus* 147.

3.5 Referencias

Aguirre-loredo, R. Y., & Rodríguez-hernández, A. I. (2014). Physical properties of

emulsified films based on chitosan and oleic acid. *CyTA – Journal of Food*, 12(4), 305–312.
<http://doi.org/10.1080/19476337.2013.853207>

Ali, A., Xie, F., Yu, L., Liu, H., Meng, L., & Khalid, S. (2017). Preparation and characterization of starch-based composite films reinforced by polysaccharide-based crystals. *Composites Part B*. <http://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.09.017>

Anacarso, I., de Niederhäusern, S., Iseppi, R., Sabia, C., Bondi, M., & Messi, P. (2011). Anti-listerial activity of chitosan and Enterocin 416K1 in artificially contaminated RTE products. *Food Control*, 22(12), 2076–2080. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.001>

ASTM. ASTM 96-92: Standard test methods for water vapour transmission of materials (1992).

Basch, C. Y., Jagus, R. J., & Flores, S. K. (2013). Physical and Antimicrobial Properties of Tapioca Starch-HPMC Edible Films Incorporated with Nisin and / or Potassium Sorbate, 2419–2428. <http://doi.org/10.1007/s11947-012-0860-3>

Cé, N., Noreña, C. P. Z., & Brandelli, A. (2012). Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin, 6337, 20–26. <http://doi.org/10.1080/19476337.2010.537371>

Davidović, S., Miljković, M., Tomić, M., Gordić, M., Nešić, A., & Dimitrijević, S. (2018). Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* T3. *Carbohydrate Polymers*, 184 (September 2017), 207–213. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061>

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, 114, 1173–1182. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>

Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C*, 33(4), 1819–1841. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>

Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010).

Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4), 349–356. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>

Ganesan, A. R., Shanmugam, M., & Bhat, R. (2018). Producing novel edible films from semi refined carrageenan (SRC) and ulvan polysaccharides for potential food applications, #pagerange#. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.089>

Homez-Jara, A., Daza, L. D., Aguirre, D. M., Muñoz, J. A., Solanilla, J. F., & Váquiro, H. A. (2018). Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233–1240. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.057>

Ibarguren, C., Vivas, L., Alejandra Bertuzzi, M., Apella, M. C., & Carina Audisio, M. (2010). Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(7), 1443–1449. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02286.x>

Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, S., & Mujtaba, M. (2018). Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *Royal society of chemistry*, 8, 3941–3950. <http://doi.org/10.1039/c7ra12070b>

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carmo Avides, M. D. O., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1884–1891. <http://doi.org/10.1021/jf902774z>

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>

Mihaly Cozmuta, A., Turila, A., Apjok, R., Ciocian, A., Mihaly Cozmuta, L., Peter, A., ... Benković, T. (2015). Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. *Food Hydrocolloids*, 49, 144–155.

<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.022>

Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2010). Factors Affecting the Moisture Permeability of Lipid- Based Edible Films : A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 67–89. <http://doi.org/10.1080/10408690290825466>

Nouraddini, M., Esmaili, M., & Mohtarami, F. (2018). Development and characterization of edible films based on eggplant flour and corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1639–1645. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.126>

Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 44, 146–151. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.054>

Piedrahita-Marquéz, D.-G. (2017). Utilización de flavonoides en recubrimientos comestibles para la conservación de productos acuícolas. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado a partir de <http://bdigital.unal.edu.co/56655/7/David G.PiedrahitaMárquez.2017.pdf>

Piedrahita-Marquéz, D. G., Fuenmayor, C. A., & Suarez Mahecha, H. (2018). Effect of chitosan - propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (*Piaractus brachypomus*) vacuum - packed fish fillets. *Packaging technology and science*, (November), 1–11. <http://doi.org/10.1002/pts.2422>

Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 859–865. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>

Qin, Y., Zhang, Z., & Li, L. (2015). Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind, 52(March), 1471–1479. <http://doi.org/10.1007/s13197-013-1137-1>

Quintero-Salazar, B., Vernon-Carter, J., Guerrero-Legarreta, I., & Ponce-Alquicira, E. (2005). Incorporation of the Antilisterial Bacteriocin-like Inhibitory Substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into Film-forming Protein Matrices with Different Hydrophobicity. *Food microbiology and safety*, 70(9), 398–403.

Rubentheren, V., Ward, T. A., Yern, C., & Praveena, C. (2015). Physical and chemical reinforcement of chitosan film using nanocrystalline cellulose and tannic acid. *Cellulose*, 22(4), 2529–2541. <http://doi.org/10.1007/s10570-015-0650-y>

Santiago-Silva, P., Soares, N. F. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A. W., Barbosa, K. B. F., Volp, A. C. P., ... Würlitzer, N. J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20(1), 85–89. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.006>

Shapi, R., & Othman, S. (2016). Effect of concentration of chitosan on the mechanical, morphological and optical properties of tapioca starch film. *International food research journal*, 23(December), 187–193.

Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Food Hydrocolloids Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food hydrocolloids*, 24(8), 770–775. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>

Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2013). Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of antimicrobial agent. *Journal of Food Engineering*, 119(1), 140–149. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.020>

Torres-León, C., Vicente, A. A., Flores-López, M. L., Rojas, R., Serna-Cock, L., Alvarez-Pérez, O. B., & Aguilar, C. N. (2018). Edible films and coatings based on mango (var. Ataulfo) by-products to improve gas transfer rate of peach. *LWT*, 97(July), 624–631. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.057>

Wang, X., Guo, C., Hao, W., Ullah, N., Chen, L., Li, Z., & Feng, X. (2018). Development and characterization of agar-based edible films reinforced with nano-bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 722–730. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.089>

4. Capítulo IV. Estudio del efecto de un recubrimiento comestible en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento de queso campesino

Resumen

El estudio de la aplicación de bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL) sobre productos alimenticios ha incrementado en los últimos años, debido a la capacidad para controlar microorganismos patógenos y causantes de deterioro durante la preservación de los alimentos. En este estudio se realizó la evaluación del efecto de recubrimientos comestibles de quitosano incorporando sobrenadante libre de células (SLC) producido por *Pediococcus pentosaceus* 147 sobre queso fresco tipo Campesino. Se estudiaron cinco tratamientos: T1 queso control sin inóculo, T2 queso control de crecimiento de *L. monocytogenes* sin aditivos, T3 queso con SLC, T4 queso con recubrimientos sin SLC y T5 queso con recubrimiento y SLC. Se observó que hubo un efecto inhibitorio del SLC y este incrementó cuando se incorporó al recubrimiento comestible. Adicionalmente algunas características fisicoquímicas se mantuvieron durante el periodo de preservación.

4.1 Introducción

El estudio y aplicación de bacteriocinas producidas por BAL como *Pediococcus* spp. se ha llevado a cabo gracias a la fácil obtención y aislamiento de estas cepas. El aislamiento de cepas bacteriocinogénicas se ha realizado principalmente a partir de productos alimenticios como el caso de *P. pentosaceus* ST65ACC a partir de queso artesanal

producido con leche cruda (Cavicchioli *et al.*, 2017), *P. acidilactici* a partir de malta (Ahn *et al.*, 2017), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* de mantequilla (Barman *et al.*, 2018), *P. pentosaceus* LU11 a partir de productos fermentados (Biswas *et al.*, 2017), *P. pentosaceus* SM-1 de salchichas secas (Anastasiadou *et al.*, 2008), entre otros.

La obtención de estas cepas ha permitido el estudio de la actividad antimicrobiana y aplicación sobre matrices alimentarias, evaluando la efectividad contra patógenos y microorganismos causantes de deterioro. Para ello se han usado diferentes estrategias de aplicación, dentro de las cuales se incluye la inoculación de las cepas productoras de bacteriocinas durante la producción del alimento y/o la adición de la bacteriocinas sintetizadas sobre la matriz (Espitia *et al.*, 2016). La aplicación de cepas productoras de bacteriocinas presenta grandes ventajas en cuanto a costo y reglamentos legales; sin embargo, es indispensable seleccionar la cepa cuidadosamente, de acuerdo con el alimento en particular, para asegurar que la cepa produzca la cantidad adecuada de bacteriocina y sea capaz de inhibir el microorganismo objetivo. Por otro lado la aplicación directa de la bacteriocina, puede tener algunas limitaciones en cuanto a la susceptibilidad de ser absorbida por algunos componentes del alimento, o ser degradada por procesos proteolíticos, y/o debido a cambios en la solubilidad o naturaleza anfifílica del péptido (Espitia *et al.*, 2016; Johnson *et al.* 2017). Con el fin de mejorar la efectividad de las bacteriocinas durante su aplicación directa, se ha empleado como estrategia de incorporación sistemas de empaque como películas y/o recubrimientos comestibles hechos a partir de diferentes materiales como polímeros que pueden llegar a modificar la atmosfera y controlar la liberación del compuesto antimicrobiano, mejorando y/o extendiendo la vida media de un producto (Johnson *et al.*, 2017).

Es así como en este capítulo se muestra el efecto de las bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147 en diferentes tratamientos, que incluye la incorporación en recubrimientos comestibles de quitosano y su evaluación sobre queso fresco tipo campesino durante el tiempo de conservación.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Preparación del queso fresco tipo campesino

El queso campesino se realizó a partir de leche cruda proveniente del Centro de Investigaciones Agropecuarias Marengo. El queso se elaboró en la planta piloto de lácteos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), de la Universidad Nacional de Colombia siguiendo el procedimiento descrito por Vásquez *et al.* (2014). Inicialmente se tomaron 40L de leche cruda con acidez de 0,15% y un porcentaje de grasa de 3,8%. La leche se filtró y pasteurizó a 62°C por 30 min. Posteriormente se dejó enfriar hasta obtener una temperatura de 32°C y se adicionó 0,15 g/L de CaCl₂ disuelto en agua y 0,02g/L de cuajo. Con el fin de permitir coagulación el queso se dejó en reposo por 30 minutos y luego de este tiempo se realizaron cortes 1x1 cm dejando en reposo otros 5 min. Se realizó agitación suave nuevamente por 30 min y se agregaron 7 g/L de NaCl. El lactosuero se extrajo completamente y se puso en un molde por 24 h a una temperatura de 4°C.

4.2.2 Inoculación y revestimiento de muestras de queso campesino

Para el estudio del efecto del recubrimiento comestible y el SLC, obtenido a partir de la cepa de *P. pentosaceus* 147, se utilizaron 75 muestras de queso campesino con un peso aproximado de 50 g. Se emplearon 5 tratamientos: **T1** (Control) Queso sin recubrimiento ni sobrenadante libre de células (SLC); **T2** (Control de crecimiento del inóculo), queso únicamente inoculado con *L. monocytogenes* ATCC 7644, **T3** Queso con una aplicación directa de SLC sobre la superficie, con una concentración de proteína total de 5,72 µg /mL (numeral 2.2.6), , **T4** Queso con recubrimientos de quitosano sin SLC y **T5** Queso con recubrimientos de quitosano con la incorporación de SLC (5,72 µg /mL). Todos los tratamientos, excepto **T1**, fueron inoculados con una suspensión de 10⁴ UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 7644, incubada durante 24 h a 37°C in caldo BHI (Tabla 4-1). Para cada tratamiento se seleccionaron 15 quesos de forma aleatoria, y se evaluaron tres muestras por tratamiento por punto de análisis.

Tabla 4-1 Tratamientos para la evaluación del efecto de las bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147 sobre queso fresco tipo campesino.

Tratamientos	Recubrimiento comestible de quitosano	SLC (5.72 µg /mL)	ATCC 7644 (10 ⁴ UFC/mL)
T1	-	-	-
T2	-	-	+
T3	-	+	+
T4	+	-	+
T5	+	+	+

Inicialmente los quesos seleccionados para los tratamientos T3, T4 y T5 se sumergieron durante 30 s en las soluciones correspondientes, previamente esterilizadas bajo luz UV (254 nm) durante 10 min. Posteriormente, los quesos se dejaron secar por 1 hora con un flujo de aire laminar vertical para asegurar la sequedad superficial. En segunda instancia, los quesos correspondientes a los tratamientos T2, T3, T4 y T5 se inocularon por cada cara con 50µL de la suspensión del inóculo. Todos los quesos se almacenaron en bolsas estériles a una temperatura de 4 °C durante 21 días. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se realizaron en intervalos regulares a los días 1, 2, 7, 14 y 21 (Martins *et al.*, 2010).

4.2.3 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos fueron realizados de acuerdo con las exigencias descritas en la Resolución 01804 de 1989 del Ministerio de Salud de la Republica de Colombia para el queso fresco (INVIMA, 1989). Debido a que el objetivo de este estudio está relacionado con la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, esta prueba se realizó a todos los tratamientos por triplicado durante cada uno de los tiempos de análisis (días 1, 2, 7, 14, 21); del mismo modo se realizó el recuento de mesófilos totales. Por el contrario, el recuento de psicrófilos, mohos y levaduras; además de la determinación de *S. aureus* y Coliformes totales/fecales se realizaron únicamente en los días 1, 7 y 21.

El recuento de *L. monocytogenes* se realizó de acuerdo a lo descrito por Iseppi *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Se tomaron 25 g de la muestra y se homogenizaron en 225mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* spp. (OXOID), luego se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 µL en la superficie de agar PALCAM con suplemento selectivo (Oxoid); esto se incubó a 37°C por 48h para hacer el recuento respectivo. Por

otro lado, el caldo de enriquecimiento para *Listeria* spp. se incubó a 30°C por 24h y a partir de este se realizaron nuevamente diluciones para su siembra en agar OXFORD (Oxoid). La confirmación de *Listeria* spp. se realizó utilizando la prueba BD BBL Crystal™ (Becton, Dickinson and Company, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante Anexo C. Para los otros análisis, se tomaron 11g de la muestra y se homogenizaron por 2 minutos, en 99 mL de agua peptonada al 0,1%. Se realizaron tres diluciones seriadas y se sembró en diferentes medios de acuerdo con el análisis a realizar (Tabla 4-2). Todos los recuentos se realizaron por triplicado.

Tabla 4-2 Especificaciones de medios y condiciones de cultivo para las pruebas microbiológicas.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	MODO DE SIEMBRA	MEDIO DE CULTIVO	CONDICIONES	PROCEDIMIENTO DESCRITO POR:
Mesófilos		Agar Plate Count (PCA, Difco)	35°C por 48 h	Yıldırım <i>et al.</i> , (2016).
Recuento de Mohos y Levaduras	Profundidad: 1 mL de la dilución.	OGY más suplemento (oxitetraciclina)	25°C de 5 a 7 días	NTC 5698 establecida por el ICONTEC (2009).
Psicrófilos		Agar Plate Count (PCA, Difco)	7°C por 5 días.	Yıldırım <i>et al.</i> , (2016).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Superficie: 100 µL de la dilución.	Agar Baird Parker.	35°C por 24 h a 48 h	NTC 4779 establecida por el ICONTEC (2007).
NMP Coliformes totales	1 mL de cada dilución en tres tubos de caldo BRILA.	Caldo Verde brillante bilis al 2 % (BGBL).	1. 35°C por 24 h	Boer (1999), ISO (1991) e ISO (2006).
NMP Coliformes fecales	1 mL de cada dilución	Caldo lactosa bilis verde brillante al 2% con campana de Durham y caldo triptófano.	45°C por 48 h	Boer (1999).

4.2.4 Análisis fisicoquímicos

Las mediciones fisicoquímicas se realizaron de acuerdo a lo propuesto por Martins *et al.* (2010) y se incluyó análisis de pH, pérdida de peso, contenido de humedad y color. El pH

del queso campesino se midió por triplicado utilizando un pH-metro JENWAY® durante los días de seguimiento establecidos. La pérdida de peso se evaluó pesando al inicio del almacenamiento y durante los siguientes 5 días de muestreo. El contenido de humedad se realizó teniendo en cuenta la diferencia entre el valor inicial y final y se consideró como pérdida de peso, siguiendo la metodología previamente descrita en el numeral 3.2.3. Por último, el color de la superficie se midió durante el almacenamiento siguiendo el procedimiento del numeral 3.2.4.

4.2.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA), seguido de prueba Tukey para comparar diferencias significativas entre tratamientos. La herramienta estadística utilizada fue R-studio. Para los análisis se tuvo en cuenta un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). Los valores fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Los análisis microbiológicos se realizaron mediante diluciones seriadas de cada una de las réplicas. El recuento de colonias se informó como Log UFC/g y las medias y desviaciones estándar fueron calculadas para cada tratamiento.

4.3 Resultados y discusión

De acuerdo con los resultados previamente obtenidos, en este trabajo se decidió incorporar SLC en los recubrimientos comestibles, en lugar de bacteriocinas purificadas. Esta decisión está relacionada con dos aspectos; el primero el SLC está compuesto por una variedad de sustancias antimicrobianas, que como lo reportan algunos autores, podría llegar a ser una ventaja debido a un posible efecto sinérgico sobre el producto (Hartmann *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2017). En segunda instancia, los procesos de purificación pueden llegar a ser más costosos y dispendiosos, que inclusive puede tener un efecto sobre el costo de los productos para el consumidor, tal y como lo referencia (Marques *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha visto que la incorporación de bacteriocinas en productos lácteos se han realizado a través de la inoculación de BAL de forma directa, o con el uso del SLC, bacteriocinas purificadas o semipurificadas (Silva *et al.*, 2018).

4.3.1 Análisis microbiológicos

▪ Efecto del SLC y recubrimiento comestible de quitosano sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Los resultados de la evaluación de la efectividad de los tratamientos frente a *L. monocytogenes* se observan en la Figura 4-1. A partir de estos análisis se puede inferir que la cepa de *L. monocytogenes* fue capaz de crecer en el queso control rápidamente (T2: sin aditivos) y alcanzó un recuento de 8,11 Log UFC/g en el día 7; comportamiento que concuerda con estudios realizados previamente por Gadotti *et al.* (2014), en el cual se alcanzó un recuento de diferentes cepas de *L. monocytogenes* de hasta 8 Log UFC/g en el día 8 en el queso fresco control.

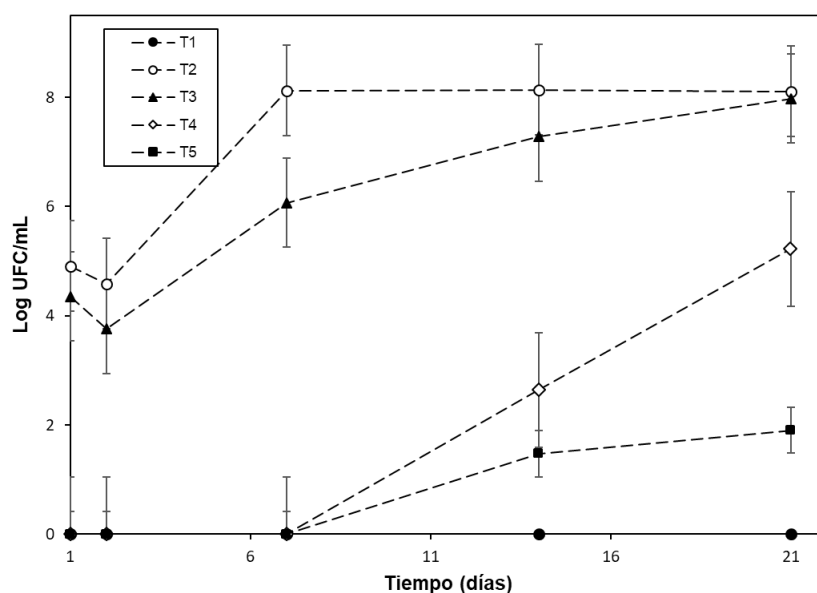


Figura 4-1 Efecto de los tratamientos adicionados sobre queso fresco en el recuento de *L. monocytogenes* durante el periodo de almacenamiento a 4°C. T1: queso control sin aditivos, T2: queso control de crecimiento sin aditivos con *L. monocytogenes* ATCC 7644, T3: SLC directo, T4: recubrimiento de quitosano sin SLC; T5: recubrimiento de quitosano y SLC.

Con respecto a T3 (queso con SLC), durante gran parte del tiempo de almacenamiento, se observó que existe un efecto inhibitorio del SLC, aplicado directamente sobre el queso, frente a *L. monocytogenes*. Los recuentos de *L. monocytogenes* para T2 (control de crecimiento) y T3 para el primer día fueron 4,91 y 4,35 Log UFC/g respectivamente, valores

que representaron una reducción de 0,56 Log UFC/g. En el segundo día los recuentos fueron de 4,59 y 3,76 Log UFC/g respectivamente, lo cual representó una reducción de 0,83 Log UFC/g. Este comportamiento presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Adicionalmente, el mayor efecto inhibitorio del SLC, aplicado de forma directa, se observó en el día 7, en el cual la reducción de crecimiento de *L. monocytogenes* de T3 con respecto a T2 fue de 2,06 Log UFC/g ($p = 2 \times 10^{-16}$). En los siguientes puntos de análisis se generó un crecimiento mayor de *Listeria* spp. hasta alcanzar en el día 21 un recuento casi similar a T2 de 7,98 Log UFC/g.

A pesar de que hubo un efecto del SLC frente al crecimiento de *L. monocytogenes*, cuando fue aplicado directamente sobre la matriz alimentaria, este fue mucho menor con respecto al efecto de los tratamientos T4 y T5. Esto puede explicarse debido a factores como la absorción y difusión del SLC dentro del alimento o por su interacción con otros componentes propios del queso. Otros autores como Hartmann *et al.* (2011) describen que la actividad antimicrobiana puede verse afectada por enzimas propias de los productos alimenticios e incluso por la microflora endógena. Al igual que en este estudio Hartmann *et al.* (2011) también observó la efectividad de diferentes SLCs, obtenidos a partir de diferentes cepas de BAL (*Enterococcus* sp., *P. acidilactici*), frente a *L. monocytogenes* en leche entera. Estos autores encontraron que la CMI de los SLCs obtenidos redujeron hasta 2,3 Log UFC/mL el crecimiento de *L. monocytogenes* frente al control. La actividad antimicrobiana del SLC es originada por la presencia de una o incluso varias bacteriocinas; además de la presencia de otros productos generados a partir de la fermentación, que como se ha descrito puede ser ácido láctico, peróxido de hidrogeno, entre otros (Shah y Rajiv, 2002). De esta manera los resultados obtenidos a partir del tratamiento T3 en esta investigación, conllevan a proponer estudios adicionales en donde se confirme la identidad y secuencia de las bacteriocinas identificadas del SLC que muestran un efecto antimicrobiano.

Por otro lado, se observó que los tratamientos T4 (recubrimiento de quitosano sin SLC) y T5 (recubrimiento de quitosano con SLC) controlaron mejor el crecimiento de *L. monocytogenes* durante los primeros 7 días de almacenamiento del queso. En el día 14, se observó crecimiento bacteriano en dichos tratamientos, con diferencias significativas ($p = 4,75 \times 10^{-6}$) respecto a los otros tratamientos. Comparando los valores obtenidos con respecto al control T2, hubo una disminución de hasta 5,49 y 6,66 Log UFC/g, del recuento

total de *L. monocytogenes*, para los tratamientos T4 y T5 respectivamente. La actividad inhibitoria que se observa en estos resultados concuerda con los resultados de actividad antimicrobiana *in vitro* realizados para el SLC y el quitosano. Otros estudios donde se ha realizado la adición de bacteriocinas a películas han mostrado efectos inhibitorios contra *L. monocytogenes*, por ejemplo Anacarso *et al.* (2011) evaluaron la actividad de películas de polietileno con ausencia y presencia de enterocina 416K1 sobre queso. Con un inóculo inicial de 10^8 UFC/mL de *L. monocytogenes* NCTC 10888 y una evaluación durante los días 0,1,4,7,14 y 28 días, observaron que las películas con bacteriocina disminuyeron en aproximadamente 1 Log UFC/g el crecimiento del inóculo comparado con las muestras que tenían películas sin bacteriocina.

Según los resultados de la Figura 4-1, se puede deducir que el tratamiento T5 mostró el mayor efecto antimicrobiano desde el día 1 hasta el día 21 de almacenamiento. T5 tuvo diferencias significativas ($p= 5,78 \times 10^{-8}$) con respecto a los demás tratamientos y en el día 21 alcanzó a disminuir el crecimiento de *L. monocytogenes* 6,21 Log UFC/g con respecto a T2 y 3,32 Log UFC/g con respecto a T4. De estos resultados, se puede inferir que el efecto antimicrobiano no sólo es por la presencia del SLC sino también por el quitosano, que tiene una capacidad antimicrobiana importante y demostrada en estudios previos (Altieri *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2016; Fajardo *et al.*, 2010); es decir que puede haber un posible efecto sinérgico entre estos dos componentes. Esto también concuerda con la actividad antimicrobiana previamente comprobada a nivel *in vitro* tanto del SLC (numeral 2.2.4) y del quitosano (numeral 3.2.7). Existen pocos estudios donde han sido evaluados recubrimientos comestibles de quitosano con la incorporación de bacteriocinas. Dentro de estos estudios se encuentra el realizado por Cui *et al.* (2016) quienes observaron resultados similares a los obtenidos en este estudio. La aplicación de recubrimientos de quitosano con y sin la adición de liposomas de nisina tuvieron un efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* y el mayor efecto fue del último tratamiento, con un valor de 2,05 UFC/cm² con respecto al control (3,25 Log UFC/ cm². Por otro lado, Anacarso *et al.* (2011) demostraron el efecto sinérgico entre el SLC, que contenía enterocina 416K1, y soluciones de quitosano al 1% frente al crecimiento de *L. monocytogenes* cuando fueron aplicados sobre alimentos listos para consumo, especialmente frutas y vegetales. Con los resultados obtenidos en este trabajo y los descritos por Anacarso *et al.* (2011) se sugiere realizar más

evaluaciones con la combinación de estas dos sustancias sobre otros quesos o nuevas matrices alimentarias, para confirmar el efecto sinérgico.

Por otro lado, cabe resaltar que los aislamientos obtenidos durante los análisis microbiológicos, a partir de agar OXFORD, fueron positivos para *L. monocytogenes*.

▪ **Efecto del SLC y recubrimiento comestible de quitosano sobre bacterias mesófilas aerobias.**

Adicional al estudio del efecto de la bacteriocina sobre *L. monocytogenes*, se evaluó su efecto sobre otros microorganismos presentes en el queso. Por lo anterior, se decidió realizar el recuento de mesófilos totales, parámetro utilizado para la aceptación de calidad de un producto. En general se puede observar en la Figura 4-2 que todos los recuentos totales de bacterias mesófilas aerobias incrementaron gradualmente durante los días de evaluación. Se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada día de análisis, entre los recuentos T2 y T3 con respecto a los tratamientos T1, T4 y T5. Estas diferencias son coherentes con los resultados obtenidos previamente; ya que el recuento de mesófilos incluye la presencia de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 inoculada. Como se observó previamente los tratamientos T4 y T5 tuvieron un efecto sobre el crecimiento del microorganismo inoculado en el queso campesino, a esto se le atribuye recuentos totales de mesófilos menores. De igual forma el tratamiento T3 concuerda con los análisis previos y se observa que los recuentos son menores a T2. De la misma forma el tratamiento T1 confirma las condiciones de seguridad en las que fue preparado el queso campesino, debido a que los recuentos fueron menores con respecto a T2. Además, se puede observar que hubo mayor diferencia entre los recuentos en el día 7, comportamiento similar al obtenido en los recuentos del *L. monocytogenes*; y hacia el final del periodo de almacenamiento los recuentos de cada uno de los tratamientos variaron entre 7,36 Log/mL y 8,27 Log/mL, resultados que no tuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,067$).

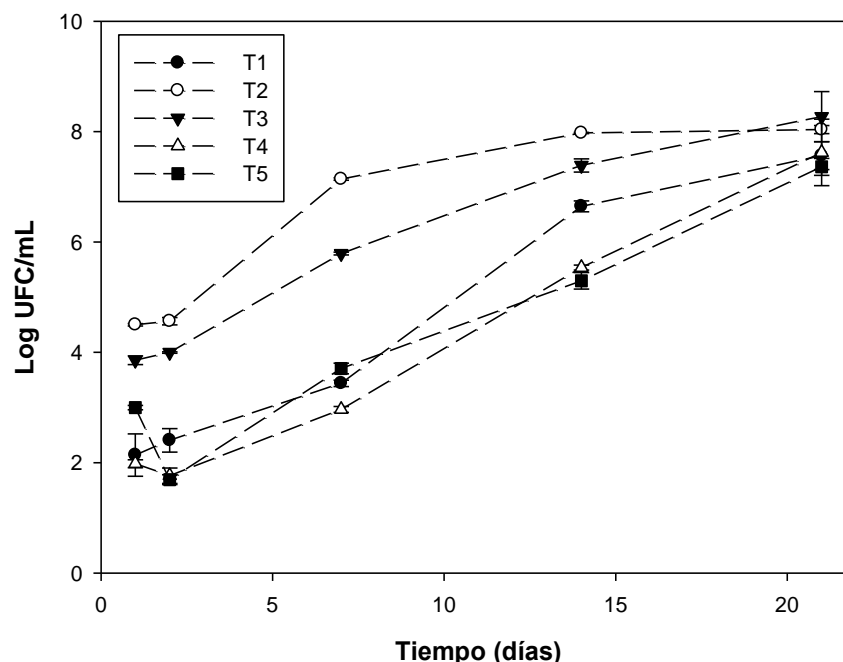


Figura 4-2 Recuento de mesófilos totales durante el periodo de almacenamiento a 4°C de queso campesino. T1: queso control sin aditivos, T2: queso control de crecimiento sin aditivos con *L. monocytogenes* ATCC 7644, T3: SLC directo, T4: recubrimiento de quitosano sin SLC; T5: recubrimiento de quitosano y SLC.

Análisis microbiológicos realizados por Fajardo *et al.* (2010) para evaluar el efecto de películas comestibles de quitosano que contenían natamicina, mostraron que no hubo diferencias significativas en el recuento de mesófilos totales en muestras de queso Saloio. Sin embargo, a diferencia de este trabajo de investigación, dichos autores no inocularon las muestras con ningún tipo de microorganismo.

▪ Estudio microbiológico de Mohos y levaduras, y psicrófilos.

El resultado del análisis microbiológico de mohos y levaduras, además de psicrófilos se observan en la Tabla 4-3. En general el recuento de mohos y levaduras estuvo por debajo de los límites permitidos por el INVIMA (1989) y no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos para cada día de análisis. A pesar que no se conoce el efecto de las bacteriocinas de *P. pentosaceus* 147 sobre el crecimiento de mohos y levaduras, algunos autores aseguran que recubrimientos de quitosano, puestos en diferentes tipos de queso como Mozzarella, Emmental, Ricotta, previenen el crecimiento de mohos y levaduras

y la actividad es mejorada tras la combinación con sustancias como natamicina y lisozima, actuando de forma sinérgica (Costa *et al.*, 2018).

Tabla 4-3 Recuento de mohos y levaduras totales y psicrófilos en muestras de queso campesino. T1: queso control sin aditivos, T2: queso control de crecimiento sin aditivos con *L. monocytogenes* ATCC 7644, T3: SLC directo, T4: recubrimiento de quitosano sin SLC; T5: recubrimiento de quitosano y SLC.

	Tiempo (días)		
	1	7	14
Mohos y Levaduras			
T1	<1,00 ± 0,00 ^a	1,39 ± 0,68 ^a	4,15 ± 0,54 ^a
T2	1,16 ± 0,28 ^a	1,16 ± 0,28 ^a	3,07 ± 0,93 ^a
T3	<1,00 ± 0,00 ^a	1,16 ± 0,28 ^a	2,38 ± 0,43 ^a
T4	<1,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	4,33 ± 0,65 ^a
T5	<1,00 ± 0,00 ^a	1,16 ± 0,28 ^a	2,97 ± 1,02 ^a
Psicrófilos			
T1	2,91 ± 0,04 ^a	5,49 ± 0,04 ^b	8,57 ± 0,33 ^a
T2	2,52 ± 0,39 ^a	5,64 ± 0,03 ^a	8,56 ± 0,23 ^a
T3	1,60 ± 0,30 ^b	5,42 ± 0,01 ^{bc}	8,02 ± 0,90 ^a
T4	1,76 ± 0,15 ^b	5,34 ± 0,05 ^c	7,73 ± 0,29 ^a
T5	1,20 ± 0,17 ^b	4,74 ± 0,04 ^d	7,17 ± 0,75 ^a

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0,05$).

Por otro lado, se observaron diferencias significativas en el recuento de psicrófilos durante el día uno, en el cual T3, T4 y T5 tuvieron menor recuento comparado con T1 y T2 (Tabla 4-3), lo que posiblemente sea debido al efecto antimicrobiano de los tratamientos aplicados. Al final de los análisis no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) y se observa un aumento en el recuento, lo que puede ser debido al aumento de la carga microbiana a través del tiempo. Es importante mencionar, que los psicrófilos son microorganismos que tienen la capacidad de crecer a temperaturas bajas, además son de importancia ya que pueden causar pérdidas económicas importantes como resultado de actividades proteolíticas y lipolíticas en quesos (Fajardo *et al.*, 2010).

▪ Otros análisis microbiológicos.

Los análisis realizados al inicio, mitad y final del periodo de almacenamiento de búsqueda de *Staphylococcus aureus* y NMP de coliformes totales y fecales fueron en los dos casos resultados negativos. Lo anterior, confirmó que la preparación del queso y su almacenamiento se realizó bajo las debidas medidas de higiene y saneamiento. Esto se demuestra en todos los resultados microbiológicos obtenidos en T1 (queso control) el cual no presento crecimiento de ninguno de los microorganismos evaluados en el presente

estudio. Su vida útil, según la Resolución 02310 de 1986 del Ministerio de Salud, es de 18 a 30 días para productos refrigerados en empaque hermético o empaque al vacío, respectivamente (Ministerio de salud, 1986).

En conclusión, los tratamientos con recubrimiento comestible tuvieron un mayor efecto en el crecimiento de *L. monocytogenes*, y controlaron el crecimiento de otro tipo de flora microbiana presente en el queso campesino. Esto fue debido a la actividad antimicrobiana, comprobada a nivel *in vitro* del SLC y el quitosano, y además se puede inferir que pudo haber efecto sinérgico entre estos dos componentes antimicrobianos.

4.3.2 Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos realizados fueron pH, pérdida de peso, contenido de humedad presentados en la Tabla 4-4 y color. En cuanto al valor de pH inicial del queso para cada tratamiento con respecto al valor final, se observó que se mantuvo durante el tiempo de evaluación entre rangos aproximados de 6,4 y 6,5, valores que se encuentran en el rango normal de pH para queso campesino según lo reportado López y Novoa (2009). Se puede observar que hubo una ligera disminución de pH durante el día 21 para los tratamientos T1 y T2 que corresponden a los quesos control sin inóculo y con inóculo de *L. monocytogenes*. Esta disminución de pH puede deberse al deterioro del alimento a través del tiempo y/o la presencia de mayores cargas microbianas tanto de microorganismos de deterioro como patógenos presentes, que puede producir ácidos orgánicos a partir de su metabolismo. Se puede observar que hubo una estabilidad del pH con todos los tratamientos durante los tiempos de análisis y estos valores se mantuvieron aproximadamente alrededor de 6,5. Dal *et al.*, (2012), obtuvo resultados similares, donde no se detectó mayores diferencias de pH (valores aproximados entre 4,65 y 4,80) entre quesos frescos tipo Cottage preparados con cultivos bacteriocinogénicos que producían el SLC durante el proceso de elaboración del producto y quesos que no tenían estos cultivos. En otros casos, cuando se aplica directamente cepas como *L. paracasei* 108 y *L. plantarum* 201 sobre queso fresco tipo Minas, tampoco se han detectado diferencias significativas en los valores de pH durante el tiempo de almacenamiento (Karoline *et al.*, 2018).

Tabla 4-4 Valores de pH y humedad de muestras de queso campesino durante 21 días de almacenamiento a 4°C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	1	2	7	14	21
pH					
T1	6,48 ± 0,04 ^{ab}	6,52 ± 0,01 ^{ab}	6,47 ± 0,05 ^a	6,49 ± 0,02 ^a	6,29 ± 0,03 ^c
T2	6,53 ± 0,01 ^a	6,53 ± 0,00 ^a	6,50 ± 0,03 ^a	6,44 ± 0,05 ^a	6,19 ± 0,02 ^d
T3	6,53 ± 0,00 ^a	6,52 ± 0,00 ^{ab}	6,53 ± 0,02 ^a	6,46 ± 0,06 ^a	6,43 ± 0,04 ^b
T4	6,49 ± 0,01 ^{ab}	6,52 ± 0,01 ^{ab}	6,51 ± 0,01 ^a	6,52 ± 0,01 ^a	6,33 ± 0,04 ^b
T5	6,47 ± 0,02 ^b	6,51 ± 0,01 ^b	6,49 ± 0,01 ^a	6,53 ± 0,00 ^a	6,53 ± 0,01 ^a
Pérdida de peso (%)					
T1	0,75 ± 0,19 ^b	0,33 ± 0,05 ^b	0,98 ± 0,10 ^b	1,73 ± 0,11 ^{bc}	1,36 ± 0,49 ^b
T2	3,14 ± 0,55 ^a	2,60 ± 0,21 ^a	2,42 ± 0,82 ^{ab}	2,49 ± 0,36 ^a	2,88 ± 0,50 ^a
T3	0,85 ± 0,77 ^b	0,59 ± 0,56 ^b	1,66 ± 0,85 ^b	0,76 ± 0,15 ^d	0,84 ± 0,63 ^b
T4	0,03 ± 0,05 ^b	0,45 ± 0,40 ^b	1,04 ± 1,06 ^b	1,14 ± 0,29 ^{cd}	1,47 ± 0,35 ^b
T5	3,84 ± 0,23 ^a	2,85 ± 0,66 ^a	4,38 ± 0,68 ^a	2,21 ± 0,21 ^{ab}	0,41 ± 0,15 ^b
Humedad (%)					
T1	52,96 ± 0,87	49,43 ± 0,82	51,98 ± 1,79	52,15 ± 0,17	52,091 ± 1,36
T2	51,39 ± 1,71	52,74 ± 1,94	50,67 ± 0,62	51,86 ± 0,64	52,414 ± 0,90
T3	51,23 ± 0,48	51,61 ± 2,06	53,73 ± 2,29	51,21 ± 1,91	51,595 ± 2,07
T4	50,02 ± 1,01	50,60 ± 1,34	49,35 ± 0,71	51,24 ± 1,12	51,387 ± 1,08
T5	49,88 ± 1,07	49,99 ± 1,47	50,36 ± 2,51	50,73 ± 1,14	49,770 ± 0,92

Las diferentes letras en la misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa (Test de Tukey, $P < 0,05$).

En cuanto a la pérdida de peso del queso, de acuerdo con la Tabla 4-4 se observa que el T5 (queso con recubrimiento y SLC) tuvo un porcentaje de pérdida de peso mayor con respecto a los otros análisis ($p < 0,05$). Algunos estudios han demostrado la disminución de las tasas de transferencia de humedad y menor pérdida de peso en quesos que contienen recubrimientos basados en quitosano y almidón sin glicerol y aceite de perilla; resultados que se relacionan con los valores bajos de PVA analizados (Mei *et al.*, 2013a). En este estudio se observó que el valor de la PVA de las películas que contenían SLC fue mayor, por lo que puede suponerse que la pérdida de peso podría relacionarse con un aumento de la permeabilidad. Por otro lado, estudios realizados en quesos madurados, han observado pérdidas de peso constante (2,5 a 2,6%) tanto en quesos control sin recubrimientos o quesos con recubrimientos de quitosano incorporando extractos sólidos vegetales (Ortiz de Elguea-Culebras *et al.*, 2019).

Por otro lado, durante el tiempo de almacenamiento se observó que la humedad del queso campesino fue alrededor del 50% para todos los tratamientos durante el tiempo de conservación y no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos realizados sobre este parámetro. A pesar de que los resultados obtenidos de PVA, para los recubrimientos que contenían 5,72 $\mu\text{g/mL}$ de las bacteriocinas, fueron altos; no se observó una pérdida de agua significativa con respecto a los otros tratamientos. Por el

contrario, en un análisis realizado por Martins *et al.* (2010), quienes utilizaron películas de galactomanano incorporando nisina, observaron una mayor pérdida de humedad para las muestras de queso Ricotta que no presentaban recubrimiento comestible después de 28 días de almacenamiento. A diferencia de este estudio los análisis, de PVA para los recubrimientos que contenían nisina disminuyeron con respecto al control y efectivamente fue menor la pérdida de humedad en las muestras con este tratamiento.

Con respecto al color (Tabla 4-5), y a pesar de los diferentes tratamientos aplicados sobre el queso, se observó que los valores del parámetro L^* no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el día uno con respecto a los otros tratamientos y los controles. Esto concuerda con lo observado por Martins *et al.* (2010). Estos valores se mantuvieron sin diferencias durante los días de evaluación con un ligero cambio en el día 7; sin embargo, durante los dos días siguientes no continuó este patrón. De acuerdo con los resultados de b^* , durante el tiempo los quesos tuvieron una coloración ligeramente amarilla; sin embargo, esto no fue percibido visualmente. En general las diferencias de color ΔE no fueron significativas entre tratamientos comparado con el control.

Tabla 4-5 Valores de L^* , a^* , b^* y diferencia de color (ΔE) de muestras de queso campesino almacenadas 21 días a 4°C.

Tratamiento	1	2	7	14	21
L^*					
T1	87,26 ± 2,31 ^a	91,22 ± 0,38 ^a	87,17 ± 1,49 ^{ab}	90,90 ± 0,11 ^a	88,30 ± 1,04 ^a
T2	85,47 ± 2,01 ^a	90,84 ± 0,56 ^a	85,26 ± 2,16 ^b	90,00 ± 0,10 ^a	86,98 ± 0,19 ^a
T3	86,86 ± 2,19 ^a	90,52 ± 0,33 ^a	87,10 ± 1,42 ^{ab}	89,69 ± 1,12 ^a	86,98 ± 0,62 ^a
T4	87,79 ± 1,51 ^a	89,33 ± 3,08 ^a	84,83 ± 1,09 ^b	90,89 ± 0,32 ^a	87,30 ± 0,27 ^a
T5	88,32 ± 1,88 ^a	90,80 ± 0,67 ^a	89,75 ± 1,40 ^b	89,26 ± 0,71 ^a	86,89 ± 0,77 ^a
a^*					
T1	1,23 ± 0,08 ^a	1,05 ± 0,09 ^a	1,53 ± 0,12 ^a	1,45 ± 0,13 ^a	1,27 ± 0,06 ^a
T2	1,10 ± 0,12 ^a	0,92 ± 0,08 ^a	1,33 ± 0,11 ^a	1,40 ± 0,07 ^a	1,41 ± 0,03 ^a
T3	1,16 ± 0,10 ^a	1,11 ± 0,10 ^a	1,37 ± 0,11 ^a	1,33 ± 0,10 ^a	1,21 ± 0,10 ^a
T4	0,82 ± 0,08 ^b	1,01 ± 0,17 ^a	1,24 ± 0,11 ^a	1,33 ± 0,12 ^a	1,35 ± 0,12 ^a
T5	1,30 ± 0,09 ^a	1,13 ± 0,06 ^a	1,27 ± 0,16 ^a	1,47 ± 0,18 ^a	1,25 ± 0,11 ^a
b^*					
T1	15,53 ± 1,10 ^b	17,66 ± 0,45 ^a	18,91 ± 0,45 ^a	19,55 ± 0,20 ^a	18,30 ± 0,23 ^c
T2	15,72 ± 1,13 ^b	17,86 ± 0,41 ^a	18,24 ± 0,43 ^{ab}	19,72 ± 0,06 ^a	18,12 ± 0,49 ^c
T3	16,29 ± 0,78 ^{ab}	18,79 ± 0,55 ^a	17,69 ± 0,61 ^b	18,28 ± 0,37 ^b	20,20 ± 0,53 ^{ab}
T4	16,07 ± 0,68 ^{ab}	17,62 ± 1,05 ^a	17,96 ± 0,30 ^{ab}	19,16 ± 0,58 ^{ab}	21,11 ± 0,56 ^a
T5	19,12 ± 0,69 ^a	18,08 ± 0,44 ^a	18,90 ± 0,36 ^a	19,03 ± 0,67 ^{ab}	19,61 ± 0,16 ^b
ΔE					
T1	0,00 ± 0,00 ^a	4,52 ± 2,40 ^a	4,30 ± 1,66 ^a	3,81 ± 1,55 ^{ab}	2,91 ± 1,12 ^a
T2	0,00 ± 0,00 ^a	5,79 ± 1,57 ^a	5,66 ± 2,56 ^a	4,99 ± 2,05 ^{ab}	3,44 ± 0,15 ^a
T3	0,00 ± 0,00 ^a	4,43 ± 2,25 ^a	3,83 ± 1,02 ^a	3,02 ± 1,65 ^{ab}	3,45 ± 1,14 ^a

T4	0,00 ± 0,00 ^a	2,40 ± 1,34 ^a	4,71 ± 2,31 ^a	6,20 ± 1,41 ^a	4,10 ± 0,35 ^a
T5	0,00 ± 0,00 ^a	2,90 ± 2,13 ^a	1,49 ± 0,61 ^a	1,85 ± 0,19 ^b	2,50 ± 1,20 ^a

Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0,05$).

Algunos estudios han evaluado el color a través de pruebas sensoriales, Youssef *et al.* (2018) encontraron que el puntaje de color de las muestras de queso Karish, sin películas de quitosano, polivinil alcohol y nanopartículas de dióxido de titanio, fue disminuyendo con el tiempo, debido a la presencia de hongos y algunos microorganismos que crecieron en la superficie del queso. Por el contrario, las muestras de esta investigación nunca presentaron aparente crecimiento de microorganismos en la superficie.

4.4 Conclusiones

Con respecto a los análisis microbiológicos, fue evidente el efecto inhibitorio del SLC sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, como se observó en los tratamientos donde se aplicó de forma directa el SLC y durante la aplicación del recubrimiento comestible con el SLC. Este último tratamiento tuvo un mayor control sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, lo cual puede ser debido a una acción antimicrobiana sinérgica entre el quitosano y el SLC. De igual forma se pudo observar una disminución en el recuento total de otros microorganismos como mesófilos totales en los tratamientos que contenían SLC.

En general las características fisicoquímicas del queso fueron estables. El pH, la humedad y el color fueron estables durante el periodo de almacenamiento, con algunos cambios hacia el final del estudio. Por otro lado, a pesar de la variación en la tonalidad de color de los recubrimientos comestibles con y sin SLC, evaluada durante la caracterización de las películas, no se observaron diferencias de color marcadas cuando fueron aplicados sobre el queso campesino.

4.5 Referencias

Ahn, H., Kim, J., & Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Control, 80, 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022>

Altieri, C., Scrocco, C., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2005). Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2683–2688. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72946-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72946-5)

Anacarso, I., de Niederhäusern, S., Iseppi, R., Sabia, C., Bondi, M., & Messi, P. (2011). Anti-listerial activity of chitosan and Enterocin 416K1 in artificially contaminated RTE products. *Food Control*, 22(12), 2076–2080. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.001>

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filioysis, G., Ambrosiadis, I., & Koidis, P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6), 448–454. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.05.007>

Barman, S., Ghosh, R., & Mandal, N. C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*, 16(3), 286–296. <http://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>

Biswas, K., Upadhayay, S., Rapsang, G. F., & Joshi, S. R. (2017). Antibacterial and Synergistic Activity Against β -Lactamase-Producing Nosocomial Bacteria by Bacteriocin of LAB Isolated From Lesser Known Traditionally Fermented Products of India. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(2), 87–95. <http://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.08.008>

Boer, E. de. (1999). *Enterobacteriaceae*, coliforms and *E. coli* | Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00097-5>

Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2017). Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with anti-listerial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. *Journal of dairy science*, 1–10. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>

Costa, M. J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, 107(February), 84–92. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>

Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8598–8606. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11658>

Dal, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 58–65. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016>

Espitia, P. J. P., Otoni, C. G., & Soares, N. F. F. (2016). Pediocin Applications in Antimicrobial Food Packaging Systems. *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00036-X>

Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101(4), 349–356. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>

Gadotti, C., Nelson, L., & Diez-Gonzalez, F. (2014). Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiology*, 39, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.007>

Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 192–199. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.031>

ICONTEC. NTC 4779 Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies). (2007).

ICONTEC. NTC 5698-1. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. (2009).

INVIMA. (1989). Resolución 01804, 67(02310), 9.

Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., ... Bondi, M. (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with

Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. International Journal of Food Microbiology, 123(3), 281–287. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015>

ISO. ISO 4831. 1991 – General guidance for the enumeration of coliformes – Most probable number technique (1991).

ISO. (2006). ISO 4832: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of coliforms Colony count technique. Recuperado a partir de <https://www.iso.org/standard/38282.html>

Johnson, E. M., Jung, D. Y.-G., Jin, D. Y.-Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., & Suh, J. W. (2017). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 8398(September), 1–25. <http://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>

Karoline, W., Targino, G., Souza, D., Ramalho, L., Cardoso, R., Lima, D., ... Lima, S. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. Food Research International, 108(March), 172–182. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>

López, N., & Novoa, C. (2009). Efecto de dos niveles de grasa sobre la vida útil effect of two levels of fat on the sensory life of campesino cheese. Revista Medicina Veterinaria, 56(1), 32–40.

Marques, J. de L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruxen, C. E. dos S., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., ... Silva, W. P. da. (2017). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. Food Microbiology, 63, 159–163. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carmo Avides, M. D. O., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(3), 1884–1891. <http://doi.org/10.1021/jf902774z>

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>

Ministerio de salud. Resolución número 02310 de 1986, Pub. L. No. 02310 de 1986 (1986). <http://doi.org/10.1080/0161-118691860912>

Ortiz de Elguea-Culebras, G., Bourbon, A. I., Costa, M. J., Muñoz-Tebar, N., Carmona, M., Molina, A., ... Vicente, A. A. (2019). Optimization of a chitosan solution as potential carrier for the incorporation of *Santolina chamaecyparissus* L. solid by-product in an edible vegetal coating on 'Manchego' cheese. *Food Hydrocolloids*, 89(July 2018), 272–282. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.054>

Shah, N., & Rajiv, D. (2002). Antimicrobial Lactic Substances Including Bacteriocins Produced by Acid Bacteria Nagendra P. SHAH1 * of Life Sciences, of Technology, Melbourne City Mail Centre, Australia address: Dairy Science Dakota State Received for publication, This brief over. *Bioscience Microflora*, 21(4), 217–223.

Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>

Vásquez, J., Novoa, C., & Carulla, J. (2014). Efecto del recuento de células somáticas sobre la aptitud quesera de la leche y la calidad fisicoquímica y sensorial del queso campesino. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61(2), 171–185. <http://doi.org/https://doi.org/10.15446/rfmvz.v61n2.44680>

Yıldırım, Z., Yerlikaya, S., Öncül, N., & Sakin, T. (2016). Inhibitory Effect of Lactococcin BZ against *Listeria innocua* and Indigenous Microbiota of Fresh Beef Meat. *Food Technology and Biotechnology*, 54(3), 317–323. <http://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4373>

Youssef, A. M., El-sayed, S. M., El-sayed, H. S., Salama, H. H., Assem, F. M., & El-salam, M. H. A. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Novel bionanocomposite materials used for packaging skimmed milk acid coagulated cheese (Karish). *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1002–1011. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.165>

5. Conclusiones generales y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- El análisis *in vitro* de las bacteriocinas producidas por *P. pentosaceus* 147 permitió verificar la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y específicamente para el sobrenadante libre de células obtenido durante esta investigación (8533,33 UA/mL).
- Se determinó la concentración de proteínas totales del sobrenadante libre de células (182,89 µg/mL) obtenido a partir de la cepa *P. pentosaceus* 147 que permitió la determinación de la concentración mínima inhibitoria (5,72 µg/mL) del extracto crudo para su posterior incorporación en recubrimientos comestibles de quitosano.
- Se pudo observar un efecto antimicrobiano del sobrenadante libre en células aplicado directamente sobre queso campesino e incorporado en recubrimientos comestibles de quitosano. Se evidenció un efecto sinérgico, observando una disminución del recuento de *L. monocytogenes* de hasta 6,66 Log UFC/g comparado con el control.
- Se logró estudiar las propiedades fisicoquímicas del recubrimiento comestible que contenía concentración mínima inhibitoria del sobrenadante libre de células, antes de su aplicación en la matriz alimentaria.

5.2 Recomendaciones

Teniendo en cuenta las herramientas generadas en este trabajo de investigación y con el propósito de entender e identificar las bacteriocinas específicas que generan la actividad antimicrobiana se propone:

- Estandarizar las condiciones de expresión y purificación de los péptidos antimicrobianos de interés para así realizar la secuenciación de la misma.

- Identificar los dominios funcionales conservados que la pueden identificar como bacteriocinas de clase II.
- Realizar análisis de toxicidad en células eucariotas que permitan la aplicación y estudio en otras matrices alimenticias.

Anexos

A. Anexo: Prueba de actividad antimicrobiana en cepas conservadas a -20°C

Para este ensayo se inoculó 10 mL de caldo MRS con la 1% (v/v) de *P. pentosaceus* 147 previamente activado. 30µL del extracto crudo, obtenido de acuerdo con el numeral 2.2, fueron puestos en una placa con pozos de 5 mm de diámetro, donde previamente se había inoculado la cepa indicadora ATCC 7644. La lectura permitió observar halos de inhibición de 15 mm de diámetro.



B. Anexo: Imágenes del proceso de elaboración y aplicación de tratamientos del queso campesino.

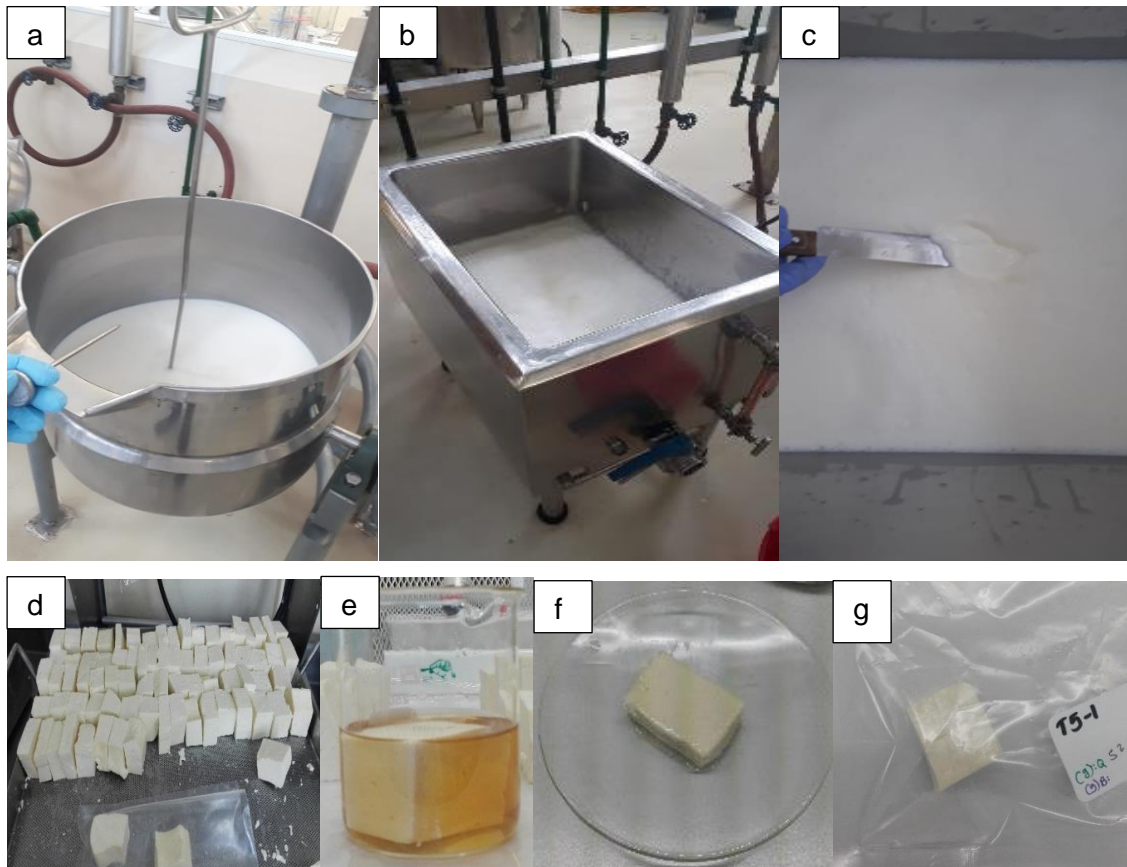
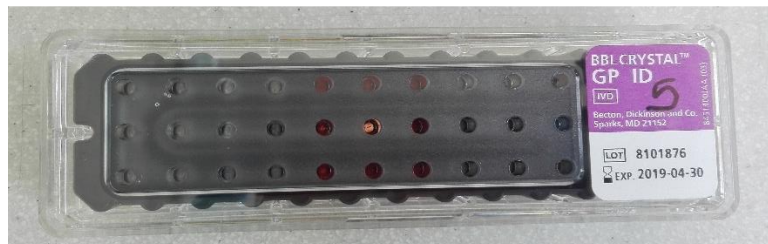


Figura 5-1 Proceso de producción de queso campesino y aplicación de tratamientos. **a, b y c** Proceso de pasteurización y aplicación de cuajo y coagulación de la leche, respectivamente; **d** Proceso de corte y medición de peso de muestras de queso (aprox. 50g); **e** inmersión de muestras de queso en SLC y/o recubrimiento comestible por 60 s; **f** proceso de secado del recubrimiento; **g** Empaque e identificación de muestras.

C. Anexo: Prueba BD BBL Crystal para identificación de bacterias Gram positivas.



PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Materiales suministrados: Equipo BD BBL Crystal GP ID –

20 tapas del panel BD BBL Crystal GP ID,

20 bases BD BBL Crystal,

20 tubos BD BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo. Cada tubo contiene aproximadamente 2,3 ± 0,15 mL de fluido de inóculo con la siguiente fórmula: KCl 7,5 g, CaCl₂ 0,5 g, Tricina N-[2-hidroxi-1, 1-bis (hidroximetil)metil] glicina 0,895 g, agua purificada a 1000 mL.

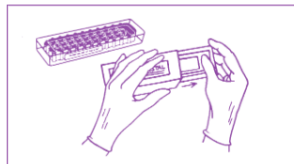
2 bandejas de incubación,

1 bloc de informes BD BBL Crystal GP ID.

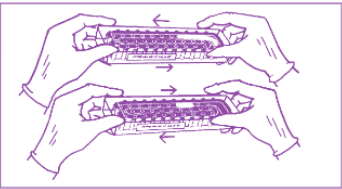
Materiales necesarios pero no suministrados: Torundas estériles de algodón (*no use torundas de poliéster*), incubadora (35–37 °C) sin CO₂ (40–60% de humedad relativa), patrón McFarland N° 0,5, visor para paneles BD BBL Crystal, Libro electrónico de códigos para los sistemas BD BBL Crystal ID o Libro de códigos manual BD BBL Crystal GP, y medio de cultivo apropiado. También son necesarios el equipo y material de laboratorio utilizado en la preparación, almacenamiento y manipulación de las muestras clínicas.

Procedimiento de la prueba: El sistema BD BBL Crystal GP ID requiere una tinción de Gram.

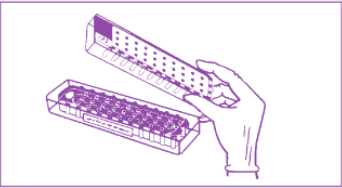
1. Saque las tapas de la envoltura. Deseche el desecante. Una vez sacadas de la envoltura, las tapas cubiertas deben usarse dentro de 1 h. No utilizar el panel si no hay desecante en la envoltura.
2. Tome un tubo de fluido de inóculo y anote el número de la muestra del paciente en la etiqueta. Usando una técnica aséptica, levante con la punta de una torunda de algodón estéril (*no use torundas de poliéster*) o con un palillo de madera o un asa plástica desechable varias colonias de la misma morfología de uno de los medios recomendados (vea la sección "Recogida y tratamiento de las muestras").
3. Ponga las colonias en suspensión en un tubo BD BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/H ID de fluido de inóculo.
4. Vuelva a taper el tubo y agite en un vórtex pro 10–15 s. La turbidez deberá ser equivalente a un patrón McFarland N° 0,5. Si la concentración de la suspensión del inóculo es mayor que el patrón McFarland recomendado, se recomienda seguir uno de los siguientes pasos:
 - a. Utilice un tubo de fluido de inóculo nuevo para preparar una nueva suspensión del inóculo equivalente a un patrón McFarland N° 0,5.
 - b. Si no hay más colonias disponibles para preparar una suspensión nueva del inóculo, utilizando técnicas asépticas diluya el inóculo agregando el mínimo volumen necesario (sin exceder 1,0 mL) de solución salina estéril al 0,85% o fluido de inóculo para reducir la turbidez a la del patrón McFarland N° 0,5. Utilizando una pipeta estéril, quite el volumen de fluido de inóculo sobrante que se ha agregado de modo que el volumen final sea aproximadamente igual al volumen original en el tubo (2,3 mL ± 0,15 mL). De no hacer este ajuste al volumen, la suspensión del inóculo se derramará por la parte negra de la base, haciendo inutilizable el panel.
5. Tome una base y anote el número del paciente en el costado.
6. Vierta todo el contenido del tubo de fluido de inóculo en el área demarcada de la base.



7. Tome la base con ambas manos, balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenen con el inóculo. Balancee la base *nuevamente* para escurrir el exceso de líquido de vuelta al área demarcada, y ponga la base sobre la mesa.



8. Alínie la tapa de modo que el extremo donde se encuentra la inscripción esté sobre el área demarcada de la base.

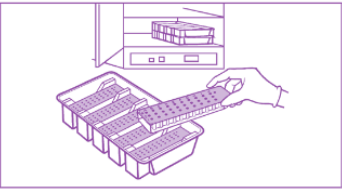


9. Presione hacia abajo hasta sentir una leve resistencia. Ponga los pulgares a cada lado del borde de la tapa en el medio del panel y presione hacia abajo simultáneamente hasta que la tapa se asiente en su lugar (se escucharán dos "golpecitos").



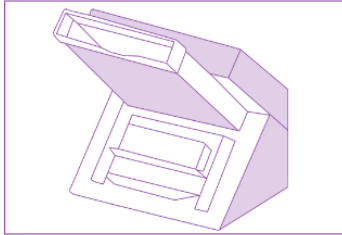
Prueba de cultivo puro: Para determinar la pureza del cultivo, extraiga una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo con un alambre estéril, antes o después de inocular la base, e inocule un tubo de agar inclinado o una placa (cualquier medio de cultivo apropiado). Deseche el tubo del fluido de inóculo con su tapón en el recipiente para desechos biopeligrosos. Incube el tubo de agar inclinado o placa durante 24–48 h a una temperatura de 35–37 °C bajo condiciones adecuadas. Este cultivo también puede utilizarse para cualquier prueba suplementaria o en serología, si fuese necesario.

Incubación: Ponga los paneles inoculados en bandejas de incubación. Se pueden poner diez paneles en una bandeja (5 filas de 2 paneles). Todos los paneles deben incubarse **boca abajo** (ventana grande hacia arriba; etiqueta hacia abajo) en una incubadora sin CO₂ con 40–60% de **humedad relativa**. No deben apilarse más de dos bandejas durante la incubación. El tiempo de incubación para los paneles es de 18–24 h a una temperatura de 35–37 °C. Si los paneles se incuban durante 24 h, éstos deben leerse dentro de 30 min después de sacarlos de la incubadora.



Lectura: Después del período de incubación recomendado, saque los paneles de la incubadora. Todos los paneles deben leerse **boca abajo** (ventana grande hacia arriba; etiqueta hacia abajo) usando el visor para paneles **BD BBL Crystal**. Consulte la plantilla de reacciones de color y/o la Tabla 3 para la interpretación de las reacciones. Use el bloc de informes **BD BBL Crystal GP** para anotar las reacciones. También puede utilizarse el lector automático **BD BBL Crystal** para leer los paneles.

- Primero, lea las columnas E a J, usando la luz blanca.
- Lea las columnas A a D (substratos fluorescentes) usando la luz UV en el visor para paneles. Un pocillo con sustrato fluorescente se considera positivo *únicamente* si la intensidad de la fluorescencia observada en el pocillo es *mayor* que la del pocillo de control negativo (4A).



Cálculo del número de perfil BD BBL Crystal: Cada reacción positiva (excepto 4A, que se utiliza como control negativo de fluorescencia) recibe un valor de 4, 2 ó 1, correspondiente a la fila donde se encuentre la reacción. Cada resultado negativo recibe un valor de 0 (cero). Los valores resultantes de cada reacción positiva en cada columna se suman. Se obtiene de esta manera un número de 10 dígitos; éste es el número de perfil.

Ejemplo:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	*	+	–	–	+	+	+	–	+	–
2	–	+	+	+	–	+	–	+	+	–
1	+	–	+	–	+	–	–	+	+	–
Perfil	1	6	3	2	5	6	4	3	7	0

*(4A) = Control negativo de fluorescencia

Bibliografía

Aguirre-loredo, R. Y., & Rodríguez-hernández, A. I. (2014). Physical properties of emulsified films based on chitosan and oleic acid. *CyTA – Journal of Food*, 12(4), 305–312. <http://doi.org/10.1080/19476337.2013.853207>

Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>

Ahn, H., Kim, J., & Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control*, 80, 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022>

Al-Seraih, A., Belguesmia, Y., Baah, J., Szunerits, S., Boukherroub, R., & Drider, D. (2017). Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(2), 205–219. <http://doi.org/10.1007/s10482-016-0791-5>

Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., ... Teixeira, P. (2009). Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20(8), 764–770. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.021>

Albano, H., Todorov, S. D., van Reenen, C. A., Hogg, T., Dicks, L. M. T., & Teixeira, P. (2007). Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 239–247. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.011>

Ali, A., Xie, F., Yu, L., Liu, H., Meng, L., & Khalid, S. (2017). Preparation and characterization of starch-based composite films reinforced by polysaccharide-based crystals. *Composites Part B*. <http://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.09.017>

Aloui, H., & Khwaldia, K. (2016). Natural Antimicrobial Edible Coatings for Microbial Safety and Food Quality Enhancement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1080–1103. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12226>

Altieri, C., Scrocco, C., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2005). Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2683–2688. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72946-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72946-5)

Anacarso, I., de Niederhäusern, S., Iseppi, R., Sabia, C., Bondi, M., & Messi, P. (2011). Anti-listerial activity of chitosan and Enterocin 416K1 in artificially contaminated RTE products. *Food Control*, 22(12), 2076–2080. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.001>

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., & Koidis, P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6), 448–454. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.05.007>

Apolônio, A. C. M., Carvalho, M. A. R., Bemquerer, M. P., Santoro, M. M., Pinto, S. Q., Oliveira, J. S., ... Farias, L. M. (2007). Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. *Journal of Applied Microbiology*, 0(0), 071008041820002–??? <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03565.x>

ASTM. ASTM 96-92: Standard test methods for water vapour transmission of materials (1992).

Barbosa, A. A. T., Silva de Araújo, H. G., Matos, P. N., Carnelossi, M. A. G., & Almeida de Castro, A. (2013). Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2–3), 135–140. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.004>

- Barman, S., Ghosh, R., & Mandal, N. C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*, 16(3), 286–296. <http://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>
- Basch, C. Y., Jagus, R. J., & Flores, S. K. (2013). Physical and Antimicrobial Properties of Tapioca Starch-HPMC Edible Films Incorporated with Nisin and / or Potassium Sorbate, 2419–2428. <http://doi.org/10.1007/s11947-012-0860-3>
- Biswas, K., Upadhayay, S., Rapsang, G. F., & Joshi, S. R. (2017). Antibacterial and Synergistic Activity Against β -Lactamase-Producing Nosocomial Bacteria by Bacteriocin of LAB Isolated From Lesser Known Traditionally Fermented Products of India. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(2), 87–95. <http://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.08.008>
- Bockelmann, W., Koslowsky, M., Goerges, S., Scherer, S., Franz, C. M. A. P., & Heller, K. J. (2017). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. *Food Control*, 71, 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.019>
- Boer, E. de. (1999). *Enterobacteriaceae*, coliforms and *E. coli* | Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00097-5>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bruno, M. E. C., & Montville, T. J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 3003–3010.
- Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2017). Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with anti-listerial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. *Journal of dairy science*, 1–10. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>

Cavicchioli, V. Q., Camargo, A. C., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2018). Potential Control of *Listeria monocytogenes* by Bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* ST57ACC and *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC Strains Isolated From Artisanal Cheese.

Cé, N., Noreña, C. P. Z., & Brandelli, A. (2012). Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin, 6337, 20–26. <http://doi.org/10.1080/19476337.2010.537371>

Chen, C., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Li, W., & Dong, M. (2014). A newly discovered bacteriocin from *Weissella hellenica* D1501 associated with Chinese Dong fermented meat (Nanx Wudl). Food Control, 42, 116–124. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.031>

Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. comprehensive reviews in food science and food safety, 2.

Costa, M. J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. Food Research International, 107(February), 84–92. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature reviews. Microbiology, 3(10), 765–776. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1240>

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nature reviews. Microbiology, 11(2), 95–105. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2937>

Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 99(11), 8598–8606. <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11658>

Dal, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. International Journal of Food Microbiology, 153(1–2), 58–65. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016>

Dalton, J., & Hill, C. (2011). Encyclopedia of Dairy Sciences. Encyclopedia of Dairy Sciences. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Davidović, S., Miljković, M., Tomić, M., Gordić, M., Nešić, A., & Dimitrijević, S. (2018). Response surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* T3. Carbohydrate Polymers, 184(September 2017), 207–213. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061>

De Souza, P., Converti, A., Gierus, M., & De Souza, R. (2018). Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*: from shake flasks to bioreactor. Molecular Biology Reports, 0(0), 0. <http://doi.org/10.1007/s11033-018-4495-y>

Deegan, L. H., Cotter, P. D., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, 16(9), 1058–1071. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>

Drosinos, E. H., Mataragas, M., & Paramithiotis, S. (2008). Antimicrobial activity of bacteriocins and their applications. Meat Biotechnology, 375–397. http://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5_17

Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, 114, 1173–1182. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>

Eds, D. R. (2011). Prokaryotic Antimicrobial Peptides. (D. Drider & S. Rebuffat, Eds.) Natural History. New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5>

Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. Materials Science and Engineering C, 33(4), 1819–1841. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>

Erginkaya, Z., Kalkan, S., & Unal, E. (2018). Use of Antimicrobial Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Food Safety. Dairy Industries International (Vol. 83). <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1378-7>

Espitia, P. J. P., Otoni, C. G., & Soares, N. F. F. (2016). Pediocin Applications in Antimicrobial Food Packaging Systems. Antimicrobial Food Packaging. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00036-X>

Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. Journal of Food Engineering, 101(4), 349–356. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>

Fallis, A. . (2013). Food Microbiology Protocols. (J. F. Spencer & A. L. Ragout, Eds.) Journal of Chemical Information and Modeling (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Favaro, L., Barretto Penna, A. L., & Todorov, S. D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation? Trends in Food Science and Technology, 41(1), 37–48. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>

FDA. (2016). Compliance Policy Guides - CPG Sec. 555.320 *Listeria monocytogenes*. Recuperado el 16 de abril de 2017, a partir de <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm>

Ferrari, I. da S., de Souza, J. V., Ramos, C. L., da Costa, M. M., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. Food Microbiology, 60, 29–38. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014>

Gadotti, C., Nelson, L., & Diez-Gonzalez, F. (2014). Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. Food Microbiology, 39, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.007>

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 120(1–2), 51–70. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>

- Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Food Biopreservation. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2029-7_1
- Ganesan, A. R., Shanmugam, M., & Bhat, R. (2018). Producing novel edible films from semi refined carrageenan (SRC) and ulvan polysaccharides for potential food applications, #pagerange#. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.089>
- Goulhen, F., Meghrou, J., & Lacroix, C. (1998). Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 387–397. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00526.x>
- Grande, M. J., Lucas, R., Valdivia, E., Abriquel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., ... Gálvez, A. (2005). Stability of Enterocin AS-48 in Fruit and Vegetable Juices. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2085–2094. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2085>
- Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., & Cogliano, V. (2006). Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology*, 7(8), 628–629. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70789-6](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70789-6)
- Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018a). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. *Annals of Microbiology*, 68(6), 383–398. <http://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>
- Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018b). Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02952>
- Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 192–199. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.031>
- Homez-Jara, A., Daza, L. D., Aguirre, D. M., Muñoz, J. A., Solanilla, J. F., & Váquiro, H. A. (2018). Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer

concentrations and drying temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233–1240. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.057>

Hu, Y., Liu, X., Shan, C., Xia, X., Wang, Y., Dong, M., & Zhou, J. (2017). Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, 77, 290–297. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.007>

Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., & Haertlé, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*, 78, 187–195. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.060>

IARC International Agency for Research on Cancer. (2010). Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. *International Agency for Research on Cancer*, 94. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326541/>

Ibarguren, C., Vivas, L., Alejandra Bertuzzi, M., Apella, M. C., & Carina Audisio, M. (2010). Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(7), 1443–1449. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02286.x>

ICONTEC. NTC 4779 Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies). (2007).

ICONTEC. NTC 5698-1. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. (2009).

ICTA. (1988). Manual de elaboración de queso campesino y prensado.

INVIMA. (1989). Resolución 01804, 67(02310), 9.

Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., ... Bondi, M. (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 281–287. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015>

ISO. ISO 4831. 1991 – General guidance for the enumeration of coliformes – Most probable number technique (1991).

ISO. (2006). ISO 4832: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of coliforms Colony count technique. Recuperado a partir de <https://www.iso.org/standard/38282.html>

Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), 171–200.

Johnson, E. M., Jung, D. Y.-G., Jin, D. Y.-Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., & Suh, J. W. (2017). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398 (September), 1–25. <http://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>

Kana, J. R., & Meimandipour, A. (2017). Antimicrobial Activity of Chitosan Film Forming Solution Enriched with Essential Oils; an in Vitro Assay. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 111–119. <http://doi.org/10.15171/ijb.1360>

Karoline, W., Targino, G., Souza, D., Ramalho, L., Cardoso, R., Lima, D., Lima, S. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108(March), 172–182. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>

Katharopoulos, E., Touloupi, K., & Touraki, M. (2016). Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 123–131. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.003>

Kaur, R., & Tiwari, S. K. (2018). Membrane-acting bacteriocin purified from a soil isolate *Pediococcus pentosaceus* LB44 shows broad host-range. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 810–816. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.062>

Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, S., & Mujtaba, M. (2018). Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for

active food packaging. Royal society of chemistry, 8, 3941–3950. <http://doi.org/10.1039/c7ra12070b>

Kazakov, T., Kristiansen, P. E., Kuipers, A., Kuipers, O. P., Lucas, R., Martin-Visscher, L. A., ... Zendo, T. (2011). Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications. (D. Drider & S. Rebuffat, Eds.). Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/9781441976976925>

Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Chareonpornsook, K., ... Visessanguan, W. (2012). Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. Food Control, 25(1), 190–196. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.005>

Kumar, K. N., Devadas, S. M., Murugan, S., Krishnan, S. G., & Thayumanavan, T. (2018). Production and Characterization of Bacteriocin by Lactic Acid Bacterium- *Pediococcus pentosaceus* NKSM1 Isolated from Fermented ' Appam ' Batter. Journal of pure and applied microbiology, 12(3), 1315–1330.

Kumari, A., Akkoç, N., & Akçelik, M. (2012). Purification and partial characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. lactis LL171. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4), 1647–1655. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0971-4>

Kuo, Y. C., Liu, C. F., Lin, J. F., Li, A. C., Lo, T. C., & Lin, T. H. (2013). Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(1), 237–246. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4149-2>

Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. (W. H. Sperber & M. P. Doyle, Eds.). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1>

López, N., & Novoa, C. (2009). Efecto de dos niveles de grasa sobre la vida útil effect of two levels of fat on the sensory life of campesino cheese. Revista Medicina Veterinaria, 56(1), 32–40.

Lv, X., Ma, H., Sun, M., Lin, Y., Bai, F., Li, J., & Zhang, B. (2018). A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control*, 89, 22–31. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.002>

Mahdi, L., Al, S., & Zwain, L. (2015). The Effect of *Pediococcus pentosaceus* Bacteriocin on *Listeria monocytogenes* in Soft Cheese. *International Conference on Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical and Food Sciences*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.15242/IICBE.C0615069>

Malheiros, P. da S., Sant'Anna, V., Barbosa, M. de S., Brandelli, A., & Franco, B. D. G. de M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 272–277. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004>

Malik, A., Alves, M., & Grohmann, E. (2014). Management of microbial resources in the environment. *Management of Microbial Resources in the Environment*, 1–530. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2>

Marques, J. de L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruxen, C. E. dos S., Halal, S. L. M. El, Dias, A. R. G., ... Silva, W. P. da. (2017). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Microbiology*, 63, 159–163. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carmo Avides, M. D. O., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1884–1891. <http://doi.org/10.1021/jf902774z>

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013a). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>

Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013b). Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>

Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75–90. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>

Mihaly Cozmuta, A., Turila, A., Apjok, R., Ciocian, A., Mihaly Cozmuta, L., Peter, A., ... Benković, T. (2015). Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. *Food Hydrocolloids*, 49, 144–155. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.022>

Ministerio de salud. Resolución número 02310 de 1986, Pub. L. No. 02310 de 1986 (1986). <http://doi.org/10.1080/0161-118691860912>

Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Ant. van Leeuwenhoek*, 76, 185–198.

Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2010). Factors Affecting the Moisture Permeability of Lipid- Based Edible Films : A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 67–89. <http://doi.org/10.1080/10408690290825466>

Muhialdin, B. J., Hassan, Z., & Saari, N. (2013). Lactic acid bacteria in biopreservation and the enhancement of the functional quality of bread. *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, (September), 155–172. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1909.5760>

Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., & Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162(2), 99–107. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.014>

Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. D. C., & De La Torre, A. H. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria*

monocytogenes and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. Meat Science, 72(1), 57–61. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.06.004>

Nouraddini, M., Esmaili, M., & Mohtarami, F. (2018). Development and characterization of edible films based on eggplant flour and corn starch. International Journal of Biological Macromolecules, 120, 1639–1645. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.126>

Okereke, A., & Montville, T. J. (1991). Bacteriocin-Mediated Inhibition of *Clostridium-Botulinum* Spores by Lactic-Acid Bacteria at Refrigeration and Abuse Temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 57(12), 3423–3428. Recuperado a partir de si

Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. Food Control, 44, 146–151. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.054>

Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2016). Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. Food Control, 59, 737–742. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.056>

Ortiz de Elguea-Culebras, G., Bourbon, A. I., Costa, M. J., Muñoz-Tebar, N., Carmona, M., Molina, A., ... Vicente, A. A. (2019). Optimization of a chitosan solution as potential carrier for the incorporation of *Santolina chamaecyparissus* L. solid by-product in an edible vegetal coating on 'Manchego' cheese. Food Hydrocolloids, 89(July 2018), 272–282. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.054>

Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology, 79(1–2), 3–16. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)

Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microbial cell factories, 13 Suppl 1(Suppl 1), S3. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>

Piedrahita-Marquéz, D.-G. (2017). Utilización de flavonoides en recubrimientos comestibles para la conservación de productos acuícolas. Universidad Nacional de

Colombia. Recuperado a partir de [http://bdigital.unal.edu.co/56655/7/David G.PiedrahitaMárquez.2017.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/56655/7/David%20G.PiedrahitaMárquez.2017.pdf)

Piedrahita-Marquéz, D. G., Fuenmayor, C. A., & Suarez Mahecha, H. (2018). Effect of chitosan - propolis edible coatings on stability of refrigerated cachama (*Piaractus brachypomus*) vacuum - packed fish fillets. *Packaging technology and science*, (November), 1–11. <http://doi.org/10.1002/pts.2422>

Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240–246. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.017>

Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. P. S. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361–374. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>

Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 859–865. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>

Qin, Y., Zhang, Z., & Li, L. (2015). Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind, 52(March), 1471–1479. <http://doi.org/10.1007/s13197-013-1137-1>

Quintero-Salazar, B., Vernon-Carter, J., Guerrero-Legarreta, I., & Ponce-Alquicira, E. (2005). Incorporation of the Antilisterial Bacteriocin-like Inhibitory Substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into Film-forming Protein Matrices with Different Hydrophobicity. *Food microbiology and safety*, 70(9), 398–403.

Ramu, R., Shirahatti, P. S., Devi, A. T., Prasad, A., J, K., M, S. L., ... M, N. N. (2015). Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 8398(March 2016), 0. <http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1020918>

Rubentheren, V., Ward, T. A., Yern, C., & Praveena, C. (2015). Physical and chemical reinforcement of chitosan film using nanocrystalline cellulose and tannic acid. *Cellulose*, 22(4), 2529–2541. <http://doi.org/10.1007/s10570-015-0650-y>

Sadishkumar, V., & Jeevaratnam, K. (2017). Purification and partial characterization of antilisterial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* KJBC11 from Idli batter fermented with Piper betle leaves, (February). <http://doi.org/10.1111/jfbc.12460>

Salar, R. K., Siwach, P., Gahlawat, S. K., & Duhan, J. S. (2013). Biotechnology: Prospects and applications. *Biotechnology: Prospects and Applications*, 9788132216, 1–315. <http://doi.org/10.1007/978-81-322-1683-4>

Santiago-Silva, P., Soares, N. F. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A. W., Barbosa, K. B. F., Volp, A. C. P., ... Würdlitz, N. J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20(1), 85–89. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.006>

Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 123–138. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>

Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Cocconcelli, P. S., & Poznanski, E. (2011). Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(5), 883–890. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.003>

Shah, N., & Rajiv, D. (2002). Antimicrobial Lactic Substances Including Bacteriocins Produced by Acid Bacteria Nagendra P. SHAH1 * of Life Sciences, of Technology, Melbourne City Mail Centre, Australia address: Dairy Science Dakota State Received for publication, This brief over. *Bioscience Microflora*, 21(4), 217–223.

Shapi, R., & Othman, S. (2016). Effect of concentration of chitosan on the mechanical, morphological and optical properties of tapioca starch film. *International food research journal*, 23(December), 187–193.

Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>

Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Food Hydrocolloids Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food hydrocolloids*, 24(8), 770–775. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>

Sistema Nacional de Salud y Ministerio de Protección Social. (2011). Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. INS, Ministerio de Salud y Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1–29.

Suárez, H., De Francisco, A., & Beirao, L. (2008). Influencia de Bacteriocinas Producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 Sobre la Vida Útil de Filetes del Híbrido de Cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* Empacado al Vacío. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmaceutica*, 15(1), 32–40.

Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2013). Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of antimicrobial agent. *Journal of Food Engineering*, 119(1), 140–149. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.020>

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40(1), 365–370. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.011>

Torres-León, C., Vicente, A. A., Flores-López, M. L., Rojas, R., Serna-Cock, L., Alvarez-Pérez, O. B., & Aguilar, C. N. (2018). Edible films and coatings based on mango (var. Ataulfo) by-products to improve gas transfer rate of peach. *LWT*, 97(July), 624–631. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.057>

- Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. (2015). Natural Pectin Polysaccharides as Edible Coatings. *Coatings*, 5(4), 865–886. <http://doi.org/10.3390/coatings5040865>
- Vásquez, J., Novoa, C., & Carulla, J. (2014). Efecto del recuento de células somáticas sobre la aptitud quesera de la leche y la calidad fisicoquímica y sensorial del queso campesino. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61(2), 171–185. <http://doi.org/https://doi.org/10.15446/rfmvz.v61n2.44680>
- Vásquez M, S. M., Suárez M, H., & Montoya, O. I. (2009). Evaluation of bacteriocins as protective means for the biopreservation of refrigerated meat. *Revista chilena de nutrición órgano oficial de la Sociedad Chilena de Nutrición Bromatología y Toxicología*, 36(3), 228–238. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182009000300005>
- Vera, E., Salvucci, E., Sesma, F., & Nader-Macías, M. E. (2014). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Viana de Souza, J., & Silva Dias, F. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 13, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.003>
- Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. *Biomed. Chromatogr.*, 27, 1497–1502. <http://doi.org/10.1002/bmc.29481497>
- Vijay, B., Sood, S. K., Kumariya, R., & Garsa, A. K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research*, 167(9), 544–549. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.001>
- Wang, X., Guo, C., Hao, W., Ullah, N., Chen, L., Li, Z., & Feng, X. (2018). Development and characterization of agar-based edible films reinforced with nano-bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 722–730. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.089>
- Winkelströter, L. K., Tulini, F. L., & De Martinis, E. C. P. (2015). Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its

potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. LWT - Food Science and Technology, 64(2), 586–592. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>

Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwathana, A., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Science, 120, 118–132. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>

Yangilar, F. (2016). Effect of the Fish Oil Fortified Chitosan Edible Film on Microbiological, Chemical Composition and Sensory Properties of Göbek Kashar Cheese during Ripening Time. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 36(3), 377–388. <http://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.3.377>

Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B., & Lü, X. (2016). Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. Food Control, 67, 53–62. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.008>

Yıldırım, Z., Yerlikaya, S., Öncül, N., & Sakin, T. (2016). Inhibitory Effect of Lactococcin BZ against *Listeria innocua* and Indigenous Microbiota of Fresh Beef Meat. Food Technology and Biotechnology, 54(3), 317–323. <http://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4373>

Youssef, A. M., El-sayed, S. M., El-sayed, H. S., Salama, H. H., Assem, F. M., & El-salam, M. H. A. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Novel bionanocomposite materials used for packaging skimmed milk acid coagulated cheese (Karish). International Journal of Biological Macromolecules, 115, 1002–1011. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.165>

Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. Frontiers in Microbiology, 9(OCT), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02165>